

MARIA MARLUCE DOS SANTOS VILELA

FAGOCITOSE EM CRIANÇAS COM DOENÇA FALCIFORME

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual
de Campinas, para obtenção do Grau
de Doutor em Ciências na área de
Imunologia.

Orientadora: Profa. Dra. Magda Maria Sales Carneiro Sampaio

CAMPINAS

SAO PAULO - 1985

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Aos pacientes, razão de ser deste trabalho ,
pela colaboração.

Este exemplar corresponde à redação
final da tese defendida pela médica Maria
Marlene dos Santos Trilela e aprovada pela
comissão julgadora.

Luiza Anna

À Wolgrand

À Janaina e Juliana

AGRADECIMENTOS

- À Professora Dra. Magda M.S. Carneiro Sampaio, pela orientação científica deste trabalho.
- Aos Professores Drs. Daria Repka e Humberto de A. Rangel , pelo estímulo constante e principalmente pela acolhida no Laboratório de Imunologia, tornando possível a realização deste trabalho.
- Aos Professores Silvia R. Brandalise e Fernando Costa, por possibilitarem o acesso aos pacientes e pela confiança que nos dispensaram.
- Ao Professor Dr. Euclides Lima Filho, pela assessoria estatística.
- À Dra Maria Cristina Roque A. Barrera, pelas valiosas apreciações e sugestões na análise prévia deste trabalho.
- Às biólogas Elizabeth Cristina Cambiucci e Elza Miyulsi Kymura, cuja cooperação foi fundamental para a realização deste trabalho.
- Aos Professores Drs. Antônio F. Pestana e Luiz S. Prigenzi, pela permissão do uso de equipamentos dos seus laboratórios.

- Aos Professores e funcionários do Departamento de Imunologia e Microbiologia do Instituto de Biologia pelos ensinamentos e auxílio que nos prestaram, em especial à Srta. Dirce Lima.
- Aos colegas e funcionários do Setor de Hematologia Infantil do Departamento de Pediatria da Faculdade de Ciências Médicas, em especial às Srtas. Ana Lúcia Zague, Ester Correr e Tereza Marques pela prestimosa colaboração.
- À Srta. Vilma Proide, pelos desenhos.
- Aos colegas e funcionários do Departamento de Pediatria da Faculdade de Ciências Médicas, pelo estímulo e solidariedade.
- À Berta W. Vogt, pela colaboração na correção gramatical deste trabalho.
- Ao Professor Dr. Jorge Humberto Nicola, pela confecção das câmaras de Boyden.
- À coordenação do Curso de Pós-Graduação em Imunologia - Instituto de Biologia e ao Departamento de Pediatria da Faculdade de Ciências Médicas, pelo auxílio financeiro para a realização deste trabalho.

ABREVIATURAS

ConA	- concanavalina A (mitógeno predominantemente de linfócitos T)
E	- eritrócito de carneiro
EA	- eritrócito de carneiro incubado com anticorpo anti-eritrócito de carneiro
Fc	- fragmento cristalizável da imunoglobulina
GV	- glóbulo vermelho
Hb	- hemoglobina
HbF	- hemoglobina fetal
HCM	- hemoglobina corpuscular média
HE	- hematoxilina-eosina
HTC	- hematócrito
LPS	- hipopolissacarídeo
PHA	- fitohemaglutinina (mitógeno predominantemente de linfócitos T).
PMN	- polimorfonuclear
PWM	- "pokeweed mitogen" (mitógeno predominantemente de linfócitos B)
Zsn1	- zimosan incubado com soro normal
Zsp	- zimosan incubado com soro de paciente
ZNI	- zimosan não incubado

ÍNDICE

I- INTRODUÇÃO	1
II- METODOLOGIA	56
III- RESULTADOS	75
1- QUIMIOTAXIA DE POLIMORFONUCLEARES	75
2- QUIMIOTAXIA DE MONÓCITOS	83
3- FAGOCITOSE	90
4- MEDIDA DA FUNÇÃO ESPLÊNICA	109
IV- DISCUSSÃO	112
V- RESUMO E CONCLUSÕES	136
VI- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	139
VII- APÊNDICE	176

I - INTRODUÇÃO

A anemia falciforme é conhecida pelos africanos há séculos. Exames radiológicos de ossos de pessoas que viveram na África Ocidental há mais de 700 anos mostram lesões típicas dessa condição mórbida, que era denominada no dialeto de algumas tribos de "chui-chui-chui", numa evidente onomatopéia ao choro das crianças durante as crises dolorosas. Curiosamente, os doentes eram identificados por tatuagem incisional para facilitar o diagnóstico e proibir o casamento com membros sadios do grupo (revisto por RAMALHO, 1983).

Em 1910, o Dr. James B. Herrick, em Chicago, descreveu pela primeira vez a presença de hemácias com a estranha forma de foice no sangue periférico de um estudante proveniente da região das Antilhas. Tratava-se de um rapaz negróide, com história de várias internações hospitalares anteriores por anemia, icterícia, complicações pulmonares e úlceras de membros inferiores. Já no ano seguinte, Washburn relatou outro caso semelhante e, em 1915, Cooks e Meyer descreveram o terceiro. Em 1922, Mason, ao descrever o quarto caso dessa doença, empregou pela primeira vez o termo anemia falciforme (revisto por BESSIS & DELPECH, 1982).

A doença falciforme hoje é identificada como a expressão clínica da herança de dois genes alelomórficos anormais relacionados com a formação de hemoglobina, na qual pelo menos um deles é o gene para hemoglobina S (KONOTEY-AHULU, 1974). As afecções resultantes são heterogêneas, tendo como característica comum hemácias que se falcizam quando

privadas de oxigênio e que contêm hemoglobina S ($\alpha_2 \beta_2^6$ val), detectada por eletroforese e outras técnicas bioquímicas (MILNER, 1974).

Na conceituação de doença falciforme o critério de dois genes anormais deve ser invariavelmente observado (KONOTEY - AHULU, 1974). Os genótipos possíveis são a homozigose SS (anemia falciforme), dupla heterozigose para hemoglobina S e outra variante estrutural (SC, SD, SO, SE, etc.) e as associações com talassemia beta (S/ β talassemia) e persistência hereditária de hemoglobina fetal (PHHF) (WEATHERALL & CLEGG, 1972; KONOTEY - AHULU, 1974; LEHMAN & HUNTSMAN, 1974; MILNER, 1974; HUISMAN, 1979; HIGGS e col., 1982).

A hemoglobina S representa a anormalidade mais frequente das variantes estruturais da hemoglobina A. Embora seja assintomática nos heterozigotos, nos homozigotos ela produz o quadro de anemia falciforme. Além disso, a sua interação com outros defeitos hereditários da hemoglobina dá origem a um grupo heterogêneo e ainda crescente de entidades das quais as mais frequentes são as associações com a hemoglobina C e com a talassemia (WEATHERALL & CLEGG, 1972; HUISMAN, 1979; ZAGO e col., 1980). As demais associações são de ocorrência rara e de menor importância clínica.

Três dessas condições, geneticamente determinadas, podem resultar na presença predominante de hemoglobina S no sangue periférico após o período neonatal; a homozigose para S, o estado duplamente heterozigoto para S e talas-

semia beta e a heterozigose para S, associada à PHHF (KIM, 1980).

A incidência desses distintos genótipos depende da frequência dos genes anormais na população e da facilidade com que as raças portadoras dos diferentes genes se entrecruzam (ZAGO e col., 1983a e 1983b).

No Brasil, a ocorrência dessas doenças é conhecida há muitos anos, embora os dados sobre a incidência e variabilidade sejam limitados (TONDO & SALZANO, 1960 e 1962; WHO, 1966; AZEVEDO, 1973; ZAGO e col., 1980; COLOMBO & MARTINEZ, 1981). Elas são as doenças genéticas mais frequentes nas populações brasileiras, constituindo um problema de saúde pública (RAMALHO, 1983). Entretanto, dificuldades consideráveis são encontradas quando se tenta resumir os dados sobre frequência e variabilidade dessas doenças em nosso país, devido à origem étnica heterogênea da população, a qual é desigualmente distribuída em um país de dimensão continental (8,5 milhões de km²), além da escassez de informações e caracterização inadequada dos casos estudados (ZAGO & COSTA, 1985).

ANEMIA FALCIFORME

A frequência fenotípica para o gene S é de 10% a 45% em negros africanos, 8% a 12% em negros americanos e do Caribe, 5% a 30% em gregos, turcos, no Mediterrâneo, re

giões da Índia e da Ásia (WHO, 1966). Frequência semelhante à dos negros nos EUA foi estimada na população negróide brasileira, o que não difere dos demais países do continente sul americano (WHO, 1966).

Os homozigotos para o gene da hemoglobina S produzem apenas cadeias beta estruturalmente alteradas (cadeias beta-S) e, por isso, são incapazes de sintetizar a hemoglobina normal A_1 , substituindo-a totalmente pela hemoglobina S.

A hemoglobina S, cuja estrutura molecular determinada por Ingram, em 1957, difere da hemoglobina A_1 em um único resíduo de aminoácido, dos 146 que compõem a cadeia beta. Ocorre a substituição simples e específica do ácido glutâmico por valina na sexta posição de cada uma das cadeias beta ($A = \alpha_2 \beta_2^{6 \text{ glu}}$ e $S = \alpha_2 \beta_2^{6 \text{ val}}$). Daí advém o conceito de que a anemia falciforme (SS) é uma doença molecular como já haviam sugerido PAULING e col., (1949) quando descreveram que a hemoglobina de pacientes com anemia falciforme diferia da normal pela ausência de duas cargas negativas, criando um novo e amplo campo de medicina, o das moléstias moleculares (COSTA, 1981).

Esta molécula anômala, quando em concentração elevada e na forma "tensa" (t), isto é, desoxigenada, torna-se relativamente insolúvel agregando-se em longos polímeros. Nestes polímeros, os tetrâmeros se dispõem ao redor de um

eixo vertical originando, em cortes transversais, anéis de moléculas de hemoglobina empilhados uns sobre os outros. A formação destes polímeros deforma o eritrócito originando as clássicas formas das hemácias falciformes (DEAN & SCHECHTER, 1978). A polimerização intracelular da hemoglobina S desoxigenada corresponde, em essência, ao processo fisiopatológico básico subjacente às múltiplas manifestações orgânicas da anemia falciforme (FINCH, 1972).

A hemoglobina S, em consequência de sua peculiar alteração estrutural, produz, além da anemia hemolítica comprometimento de numerosos órgãos e tecidos. O quadro clínico se caracteriza por episódios agudos, habitualmente agrupados em vaso-oclusivos, hemolíticos, aplásticos e síndrome de sequestração, configurando no seu conjunto as crises de falcização. As crises vaso-oclusivas, tanto por sua frequência incomparavelmente maior, como pelas repercussões orgânicas globais que acarretam, figuram como manifestação clínica fundamental nos pacientes eritrofalcêmicos (KONOTEY - AHULU, 1974). Fatores desencadeantes, como infecções, desidratação, febre e outros, muitas vezes não detectados, são capazes de provocar uma redução abrupta na plasticidade dos eritrócitos que passam a bloquear a circulação a nível capilar. O impedimento do fluxo, permitindo remoção do oxigênio dos eritrócitos discóides estagnados, que se falcizam, desencadeia fenômenos trombo-embólicos, que representam o substrato morfológico das crises vaso-oclusivas (KONOTEY - AHULU, 1974; MILNER,

1974; DEAN & SCHECHTER, 1978).

HETEROZIGOZE DUPLA PARA HEMOGLOBINOPATIA S E β TALASSEMIA (S/ β - TALASSEMIA)

A dupla heterozigoze para S e beta (S/ β talassemia), resulta da herança de um gene para hemoglobina S de um dos genitores e de um gene para beta talassemia do outro genitor. Em consequência, o achado de manifestações clínicas de doença falciforme em portador de hemoglobina S predominantemente no sangue periférico, implica na distinção entre o estado homozigótico para S (SS-anemia falciforme) e na heterozigoze dupla para hemoglobina S e beta talassemia (S/ β - talassemia), descrita pela primeira vez por SILVERSTRONI - BIANCO em 1944. Esta associação do estigma falciforme e talassemia beta se expressa de duas formas: em uma, ocorre completa supressão da síntese da cadeia beta normal (β^A) denominada S/ β^0 talassemia, e, a outra S/ β^+ talassemia, onde há uma supressão parcial da síntese da cadeia beta A normal.

A despeito da ausência de preocupação metodológica com análises populacionais, pequenos grupos de pacientes com doença S/ β^0 têm sido estudados, sendo notável a elevada porcentagem desse genótipo (WEATHERALL, 1964; KIM e col., 1977; ZAGO e col., 1983a e 1983b).

As proporções relativas dessas duas formas em

nosso país são desconhecidas, embora o elevado contingente de indivíduos de origem africana e mediterrânea e a livre miscigenação entre eles façam supor a ocorrência de ambas. De fato, de 156 pacientes com doença falciforme atendidos em um período de quatro anos em dois hospitais universitários em Ribeirão Preto (SP), 32 possuíam o genótipo S/β^0 e 6 S/β^+ (ZAGO e col., 1980). A baixa proporção de casos S/β^+ deve-se, provavelmente, em primeiro lugar, à sua expressão clínica mais benigna e, assim, a probabilidade de ser encontrada em uma população de pacientes sintomáticos é menor. Em segundo lugar, cerca de 80 por cento dos genes β - talassemicos naquela região são do tipo β^0 e apenas 20 por cento são do tipo β^+ (ZAGO, COSTA & BOTTURA, 1981; ZAGO e col., 1983a e 1983b).

HEMOGLOBINOPATIA SC

A herança de um gene para síntese de cadeia β^S de um genitor e um gene para a síntese de cadeia β^C do outro genitor resulta em uma condição na qual as hemácias contêm aproximadamente iguais quantidades de hemoglobinas S e C.

Esta hemoglobinopatia ocorre principalmente em africanos ocidentais e seus descendentes, especialmente nas Américas do Norte e do Sul e na Índia. Os genes para β^C tem, portanto, uma distribuição limitada (LEHMANN & HUNTSMAN, 1966).

A hemoglobina anormal C difere da normal no que diz respeito à substituição do ácido glutâmico por lisina na posição 6 da cadeia beta-globina da hemoglobina. O padrão eletroforético, nesta doença, revela concentrações semelhantes de hemoglobinas S e de C (45% - 55%) e concentração de 0.2% a 8.1% de hemoglobina fetal (KIM, 1980).

INFECÇÃO EM DOENÇA FALCIFORME

A extraordinária suscetibilidade dos pacientes com doença falciforme para certas infecções causadas por bactérias encapsuladas e Salmonella sp, é amplamente demonstrada em vários estudos retrospectivos (HOOK, CAMPBELL & WEENS, 1957; ROBINSON & WATSON, 1966; KABINS & LERNER, 1970; BARRET-CONNOR, 1971; DIGGS, 1973; OVERTURF, POWARS & BARAFF, 1977; LOBEL & BOVE, 1982) e prospectivos (ROBINSON & HALPERN, 1974; POWARS, 1975; McINTOSH e col., 1980).

A associação de presença de hemoglobina S e suscetibilidade a infecções por bactérias selecionadas constitui um ponto obscuro da medicina. Sua importância clínica é reconhecida pelo fato de ser a infecção e não a crise vaso oclusiva, a manifestação mais frequente e de maior gravidade da anemia falciforme, particularmente em criança (PORTER & THURMAN, 1963; CHARACHE & RICHARDSON, 1964; THORBURN, 1969; BARRET-CONNOR, 1971; KONOTEY - AHULU, 1971; SEELER, 1972; POWARS, 1975) e, provavelmente, em todos os grupos etários (CHA-

RACHE & RICHARDSON, 1964).

Até recentemente, as crianças com hemoglobino_patia SC não haviam sido consideradas como de alto risco para infecção bacteriana (ROBINSON & WATSON, 1966; POWARS, 1975; OVERTURF, POWARS & BARAFF, 1977; MANN, 1981), exceto, possivel_lmente, para pneumonia (RIVER, ROBBINS & SCHWARTZ, 1961; POWARS, 1975). Contudo, um risco elevado de bacteremia por organismos entéricos gram negativos pode existir em crianças acima de 10 anos de idade, especialmente, em associação com osteomielite (RIVER, ROBBINS & SCHWARTZ, 1961; BARRET-CONNOR, 1971). Um risco maior de infecção pelo Streptococcus pneumoniae e Haemophilus influenzae, quando comparado à população geral, foi demonstrado em pacientes com hemoglobinopatia SC, embora com menor frequência do que em pacientes com anemia falcifor_me (ADDIEGO e col., 1981; LOBEL & BOVE, 1982; TOPLEY e col., 1982; BUCHANAN e col., 1983).

As informações disponíveis com relação ao estado duplamente heterozigoto S/ β talassemia são muito escas_sas. A frequência e a gravidade dos episódios infecciosos parecem menores do que nos homozigotos SS e hemoglobino_patia SC (BARRET-CONNOR, 1971; OVERTURF, POWARS & BARAFF, 1977; BUCHANAN e col., 1983).

Em uma revisão de necrópsias, DIGGS, em 1973, observou que 25% dos óbitos em pacientes com doença falcifor_me ocorreram nos primeiros 5 anos de vida e que as infecções

foram as causas primárias. As infecções mais severas incluem meningites e septicemias fulminantes, pneumonias, osteomielites, infecções do trato urinário e diarreias, causadas por Streptococcus pneumoniae, Salmonella sp., Haemophilus influenzae tipo b, Neisseria meningitidis, Escherichia coli, Enterobacter - Klebsiella sp e Mycoplasma sp (ONWUBALILI, 1984).

OSTEOMIELEITE EM DOENÇA FALCIFORME

As primeiras descrições de associação de anemia falciforme e infecção relatavam casos isolados de osteomielite por Salmonella sp em pacientes com anemia falciforme (CARRINGTON & DAVISON, 1925; SEIDENSTEIN, 1945; EHRENPREIS & SCHWINGER, 1952). Tal associação foi estabelecida por HODGES & HOLT em 1951 e, hoje, é amplamente confirmada na literatura (SMITH, 1953; HOOK, CAMPBELL & WEENS, 1957; HUGHES & CARROLL, 1957; DE TORREGROSA e col., 1960; HENDRICKSE & COLLARD, 1960; HOOK, 1961; DIGGS, 1967; ENGH & col., 1971; SEELER & JACOBS, 1977; SENNARA & GORRY, 1978; ADEYOKUNNU & HENDRICKSE, 1980).

Cerca de 75% das osteomielites hematogênicas, em crianças sem hemoglobinopatia, são estafilocócicas (DICH, NELSON & HALTALIN, 1975), nos pacientes com doença falciforme, mais de 70% são causadas por Salmonella sp (GIVNER,

LUDDY & SCHWARTZ, 1981). Os serotipos mais frequentemente isolados incluem a Salmonella paratyphi B, Salmonella typhimurium e Salmonella enteritidis, contribuindo com 70% das infecções (HOOK, CAMPBELL & WEENS, 1957). O segundo agente mais comum é o Staphylococcus aureus responsável por 10% das infecções (GIVNER, LUDDY & SCHWARTZ, 1981). A osteomielite por pneumococos raramente ocorre em paciente com doença falciforme à despeito de seu elevado risco para meningite e septicemia (ENGH e col., 1971).

A osteomielite por Salmonella sp é uma doença rara em pessoas com hemoglobina normal (SAPHRA & WINTER, 1957 ; BLACK, KUNZ & SWARZ, 1960), sendo sua incidência menor do que 1% após uma epidemia de Salmonella sp (DIGGS, 1967). O risco em doença falciforme é dezenas de vezes maior do que na população normal (GOLDING, MAC IVER & WENT, 1959), de forma que o diagnóstico de osteomielite por este microorganismo sugere sempre uma hemoglobinopatia. Uma revisão de 63 casos de osteomielite por Salmonella sp em crianças nigerianas, demonstrou claramente que o paciente com anemia falciforme corre o maior risco (ADEYOKUNNU & HENDRICKSE, 1980).

A osteomielite por Salmonella sp não se apresenta com curso clínico fatal e a elevada morbidade, é devida à sua forma crônica de evolução.

O mecanismo para explicar a maior suscetibilidade a osteomielite por Salmonella sp ainda não está satis

fatoriamente conhecido. Sugere-se que episódios repetidos de falcização intravascular e vaso-oclusivo desvitalizam a parede do intestino, com conseqüente invasão dos organismos Salmonella sp do intestino, para a circulação sanguínea (ADEYOKUNNU & HENDRICKSE, 1980). Portadores assintomáticos deste microorganismo são muito comuns em comunidades onde ocorre a doença falciforme. Admite-se, ainda, que a Salmonella sp teria tropismo para áreas de isquemia e necrose e, trombozes da medula óssea, infartos e necrose, tornariam o osso um local favorável à sua proliferação (ADEYOKUNNU & HENDRICKSE, 1980).

MENINGITES E SEPTICEMIAS EM DOENÇA FALCIFORME

A vulnerabilidade das crianças com genótipo SS desenvolverem meningite e septicemia pneumocócicas têm sido estudada e bem reconhecida.

ROBINSON & WATSON, em 1966, em um grupo de 252 pacientes com doença falciforme, constataram 18 episódios de meningite, em crianças abaixo de 3 anos de idade com genótipo SS, 13 dos quais causados por S.pneumoniae. Nos pacientes com hemoglobinopatia SC ou S/β não foi detectado nenhum caso de meningite.

A revisão de BARRET-CONNOR, em 1971, sobre estas infecções bacterianas em anemia falciforme, é a maior contribuição para nosso conhecimento dessa associação clínica.

Sua análise abrangeu 166 pacientes sob seguimento clínico durante 11 anos. A infecção bacteriana foi responsável por 60% das fatalidades e, a meningite pneumocócica, por 50% dos óbitos ocorridos em crianças abaixo de quatro anos de idade. Em 14 dos 166 pacientes, a autora notou que a frequência de infecção bacteriana foi mais elevada, contribuindo com 40% do total de hospitalizações ocorridas para todos os indivíduos. Os 14 pacientes, entretanto, indistinguíveis por dados clínicos ou laboratoriais dos 152 restantes, constituíam um grupo de crianças com idade inferior a 5 anos. Os padrões de morbidade relacionados com idade, em doença falciforme, são bem conhecidos (SCOTT e col., 1955; PORTER & THURMAN, 1963). POWERS (1975), confirmou esta observação em um estudo longitudinal de 422 pacientes com doença falciforme, demonstrando claramente que o período de risco maior para meningite e septicemia está na primeira década, particularmente nos primeiros cinco anos, enquanto a osteomielite por Samonella sp e a "síndrome pulmonar" são comuns em todos os grupos etários.

Comparação de risco relativo para infecções bacterianas (BARRET - CONNOR, 1971) demonstrou que as crianças com anemia falciforme apresentam suscetibilidade 300 vezes maior para meningites pneumocócicas, 116 vezes maior para meningites por H.influenzae e 25 vezes maior para osteomielite por Salmonella sp, do que as crianças normais da mesma comunidade.

Estudo de infecções pneumocócicas em crianças com anemia falciforme (SEELER, METZGER & MUFSON, 1972) demonstrou a ocorrência de 12 episódios de septicemia e meningite, ou ambos, em 10 crianças com idades que variavam de 7 meses a 8 anos. Foram isolados oito diferentes ^{sandupos} de S. pneumoniae e apesar de ser instituído tratamento adequado, ocorreram dois óbitos.

Durante um estudo prospectivo de 10 meses, em 457 crianças negras admitidas consecutivamente com infecções graves, ROBINSON & HALPERN, em 1974, observaram que a taxa de mortalidade no grupo de pacientes com anemia falciforme foi de 25% enquanto no grupo sem a doença foi de 1,5% apenas.

Nesses estudos, é aparente, em primeiro lugar, que a maior suscetibilidade às infecções pneumocócicas não é compartilhada por todos os indivíduos com anemia falciforme. Oitenta por cento das infecções pneumocócicas, foram observadas em crianças com menos de 3 anos de idade, embora este risco de infecção não seja igual para todas as crianças nesta faixa etária (BARRET - CONNOR, 1971; OVERTURF, POWARS & BARAFF, 1977). Um segundo aspecto anômalo da infecção pneumocócica nesta população é o seu poder invasivo, desenvolvendo-se rapidamente meningites e septicemias (BARRET - CONNOR, 1971; SEELER, 1972). Um terceiro aspecto é que 80% das meningites bacterianas em crianças nas idades entre 1 e 5 anos sem anemia falciforme são devidas ao H. influenzae (WHERLE e col. ,

1967), enquanto 70% das meningites nas crianças com anemia falciforme são causadas pelo S.pneumoniae (BARRET - CONNOR, 1971; OVERTURF, POWARS & BARAFF, 1977). Embora o risco de aquisição de meningite pneumocócica seja 600 vezes maior do que em crianças normais, o risco de morte, uma vez que a infecção se instalou, não parece ser maior do que em outros pacientes (BARRET - CONNOR, 1971).

Embora as meningites por H.influenzae na anemia falciforme sejam menos frequentes do que as devidas ao S.pneumoniae, elas possuem os mesmos padrões de morbidade relacionados com idade.

A septicemia bacteriana ocorre entre 10% a 15% dos pacientes com anemia falciforme (OVERTURF, POWARS & BARAFF, 1977; LOBEL & BOVE, 1982), embora tenha sido relatada, também, incidência de 30% (McINTOSH e col., 1980). Os pneumococos são os responsáveis por 70% das infecções e, estão associados a uma taxa de mortalidade entre 30% e 50% (BARRET - CONNOR, 1971; OVERTURF, POWARS & BARAFF, 1977; LOBEL & BOVE, 1982). A segunda bactéria mais comumente isolada é o H.influenzae tipo b (WARD & SMITH, 1976), seguida pela E.coli e Salmonella sp. As crianças com homozigose SS e, abaixo de 5 anos de idade, são as de maior risco. O pico de incidência e a mortalidade ocorrem entre 1 e 3 anos. A apresentação clínica pode ser altamente variável e, frequentemente, é atípica.

OUTRAS INFECÇÕES EM DOENÇA FALCIFORME

A pneumonia é uma das infecções mais frequentes na doença falciforme, em todas as idades (PETCH & SERJEANT, 1970; OPPENHEIMER & ESTERLY, 1971). Em apenas metade dos casos, é isolado um patógeno, frequentemente o pneumococo (HENDERSON, 1950 ; BARRET - CONNOR, 1971; POWARS, 1975).

As infecções do trato urinário tem uma incidência elevada, com bacteremia em pelo menos 50% dos casos em qualquer faixa etária e, pielonefrite ocorre em mais de 25% dos casos em pacientes adultos (BARRET - CONNOR, 1971; ROBINSON & HALPERN, 1974). Aproximadamente metade dos casos de infecção do trato urinário são devidos a E.coli e Enterobacter Klebsiella sp., sugerindo uma elevada suscetibilidade para Klebsiella sp.

FATORES PREDISPONENTES À INFECÇÃO NA DOENÇA FALCIFORME

A base biológica para a suscetibilidade das crianças com doença falciforme para as infecções causadas pelo S.pneumoniae, H.influenzae e N.meningitidis, tem sido atribuída principalmente a três alterações do sistema imunológico desses pacientes: um possível defeito na atividade opsonínica sérica (WINKELSTEIN & DRACHAMN, 1968), asplenia funcional (PEARSON, SPENCER & CORNELIUS, 1969) e alteração na ativação da via alternativa do sistema complemento (JOHNSTON, NEWMAN

& STRUTH, 1973; KOETHE, CASPER & RODEY, 1976; WILSON, HUGHES & LACHMAN, 1976; HAND & KING, 1978; CORRY e col., 1979). A função fagocitária de leucócitos polimorfonucleares de pacientes com doença falciforme também tem sido avaliada, na tentativa de explicar a alta frequência de infecção nesses indivíduos (DIMITROV e col., 1972; WAJIMA, 1975; FALCÃO, VOLTARELLI & BOTTURA, 1981; HERNANDEZ e col., 1983; LUO & ROWLAND, 1983). Alteração local no intestino e no osso, exaustão do sistema reticulo-endotelial devido à hemólise crônica e disfunção hepática, são referidos como outros fatores que predis põem esses pacientes à infecção causada por Salmonella sp (KAYE, GILL & HOOK, 1967; ADEYOKUNNU & HENDRICKSE, 1980).

ATIVIDADE OPSÔNICA SÉRICA NA DOENÇA FALCIFORME

A opsonização de bactéria por fatores séricos incluindo complemento e imunoglobulinas é um importante mecanismo de defesa do hospedeiro. Na ausência de imunoglobulina específica, esta opsonização depende fundamentalmente da ativação da via alternativa do complemento.

COMPLEMENTO

Atualmente se sabe que mais de 20 proteínas interagem no complexo mecanismo de ativação do sistema complemento. A maior parte destas moléculas encontra-se no san

gue em forma inativa. Este sistema tem um papel importante na resistência anti-infecciosa, uma vez que contribui para a lise de bactérias, principalmente as gram negativas e alguns virus; apresenta capacidade quimiotática para polimorfonucleares e monócitos (C5a), funciona como opsonina (C3b), além de possuir atividade de anafilatoxina (C3a e C5a), aumentando a resposta inflamatória (KLEIN, 1982b ; WINKELSTEIN, 1983). A atividade opsonizante do C3b tem sido bem demonstrada em relação ao S.pneumoniae que, sendo um germe encapsulado, apresenta mecanismos de defesa antifagocitários bem desenvolvidos (WINKELSTEIN, 1983).

A afirmação de que os pneumococos, "in vitro", são opsonizados de forma insuficiente, pelo soro de alguns pacientes com doença falciforme (WINKELSTEIN & DRACHMAN, 1968; JOHNSTON, NEWMAN & STRUTH, 1973) é reconhecida, embora, os mecanismos moleculares para esta atividade sérica opsônica ainda sejam alvo de especulações.

WINKELSTEIN & DRACHMAN, em 1968, demonstraram uma deficiência da atividade opsônica sérica em 12 de 14 crianças com anemia falciforme, através de um teste fagocitário específico. Utilizaram pneumococos serotipos 14 e 25, leucócitos polimorfonucleares e soros de indivíduos doentes e normais. Caracterizaram tais opsoninas deficientes como termo-labeis, já que o soro normal aquecido (56°C por 30 minutos) tinha sua atividade opsonizante diminuída, tornando-se semelhante à demonstrada no soro dos pacientes. Este fato se

confirmou com a observação de que a opsonização dos pneumococos só ocorria de forma suficiente, quando a sua pré-incubação era feita com soro normal fresco. Contudo, a concentração dos anticorpos anti-pneumococos (opsoninas estáveis ao calor) não distinguiu os soros de ambos os grupos e não identificou também, nenhum inibidor para a função sérica opsonica. Com relação à Samonella sp., a maior parte da atividade sérica opsonica caracterizou-se por ser estável ao calor; a presença de aglutininas específicas em quase todos os soros indicou, neste caso, que a opsonina envolvida poderia ser um anticorpo específico. Não foi detectada anormalidade da atividade hemolítica total do sistema complemento (WINKELSTEIN & DRACHMAN, 1968).

JOHNSTON, NEWMAN & STRUTH, em 1973, confirmaram o defeito sérico opsonico para pneumococos em pacientes portadores de anemia falciforme, e, sugeriram que a deficiência poderia ser da ativação da via alternativa do sistema complemento. O sistema de fagocitose utilizado por eles, quantificava o número de pneumococos serotipo 2 englobados por leucócitos polimorfonucleares, sendo dependente da redução química do NBT (Nitrobluetetrazolium), em proporção direta ao número de microorganismos ingeridos. Quantidades variadas de anticorpos específicos da classe IgG foram previamente ligados ao pneumococo, e a fagocitose estudada na presença de soro fresco de pacientes e controles. As conclusões dos autores foram as seguintes: 1) o anticorpo sozinho não promovia a

fagocitose, sendo necessário soro fresco para a completa opsonização; 2) quantidades máximas de anticorpo específico previamente fixados aos pneumococos, tanto em presença do soro de pacientes como de controle, promoviam a mesma fagocitose; 3) contudo, quantidades reduzidas de anticorpo específico fixados aos pneumococos, em presença do soro de paciente, promoviam uma fagocitose significativamente menor do que em presença do soro normal. Eles admitem que uma deficiência em anticorpo não explicaria esta diferença, pois ambos os soros não possuíam atividade aglutinante significativa para o pneumococo serotipo 2. Além disso, a atividade opsonizante normal na presença de excesso de anticorpo, os fez supor que a capacidade de fixar C3 à superfície bacteriana através da via clássica, estivesse intacta nos soros dos pacientes.

Anormalidade da via alternativa foi proposta por esses investigadores porque o soro dos pacientes na presença de EGTA (ácido-tetra-acético-etileno glicol) não foi capaz de promover a fagocitose de partículas de zimosan. A falta de fixação de C3 à superfície do zimosan, foi confirmada tanto pela incapacidade do soro anti-C3 de aglutinar essas partículas previamente incubadas como o soro, como também, pela falta de conversão de C3 para C3c detectável por imunoeletroforese. Contudo, quantidades relativamente pequenas de soro normal restauraram esta atividade dos soros dos pacientes, da mesma maneira como restaurou no sistema em que foi utilizado o pneumococo. Estes fatos sugeriram aos autores que

a deficiência estava na via alternativa do complemento e que a labilidade ao calor do fator restaurador assemelhava-se ao do fator B e talvez de outros componentes da via alternativa (JOHNSTON, NEWMAN & STRUTH, 1973).

Defeito na ativação da via alternativa do complemento, foi também demonstrado no soro de pacientes com doença falciforme utilizando-se o fator veneno de cobra (KOETHE, CASPER & RODEY, 1976); uma redução na atividade do fator D (C3 proativador convertase-C3PA), foi proposta como uma possível alteração, embora os autores não tenham quantificado 'este fator.

Posteriormente, baixa atividade da via alter-nativa associada com níveis reduzidos de fator B (C3-proati-vador) e níveis normais de fator D (C3-proativador converta-se), foram encontrados em soros de crianças com anemia falci-forme , medidos pelo método de difusão radial hemolítica ' (WILSON & HUGHES & LACHMANN, 1976). A análise de regressão, nesse estudo, demonstrou uma correlação significativa en-tre a via alternativa total e o nível do fator B. Concluíram, então, que dos fatores séricos que interagem para gerar C3 convertase pela via alternativa, o fator B (C3 proativador) e não o fator D (C3 - proativador convertase) seria a causa provável do defeito no sistema complemento em pacientes com ane-mia falciforme.

Outros investigadores, entretanto, não identi

ficaram qualquer alteração no soro de pacientes com doença falciforme que pudesse ser atribuída a via alternativa do sistema complemento.

A análise de fagocitose por neutrófilos, de pneumococos serotipo 2 marcado com ^{14}C , demonstrou que a capacidade opsonica dos soros de 28 pacientes, entre 3 meses e 16 anos de idade, com anemia falciforme, era normal. Os soros de controle e de pacientes foram tratados com EGTA, acrescentando-se magnésio, suficiente, para assegurar a função da via alternativa (PROVISOR, ALLEN & BAEHNER, 1976).

Análises quantitativas e funcionais da via alternativa foram realizadas por STRAUSS e col., 1977, no soro de crianças com anemia falciforme, na tentativa de definir esta anormalidade. A atividade hemolítica total de C3, fator B, properdina e C3b inativador foram semelhantes nos soros de pacientes e de controles. Para ativação da via alternativa eles usaram inulina e fator veneno de cobra, não sendo encontrado nenhuma diferença.

Mais recentemente, foi demonstrada redução na concentração funcional do fator B, em pacientes com doença falciforme. Considerou-se que esta anormalidade não seria de corrente de síntese reduzida e sim de excessiva ativação e consequente consumo do fator B funcionalmente ativo e, possivelmente, de outros fatores do soro (WILSON, THOMAS & SISSONS, 1979). Especula-se que o hipercatabolismo de C3 estaria ligado ao componente intravascular do processo hemolítico.

co na doença falciforme (DE CEULAER e col., 1981). Se isto fosse verdadeiro, esta anormalidade seria temporariamente revertida por transfusão de eritrócitos normais. Porém, em algumas crianças com doença falciforme e asplenia funcional, as transfusões de hemácias restauraram a função esplênica, não ocorrendo o mesmo com a infusão de plasma (PEARSON e col., 1979). Contudo, mais recentemente, o efeito benéfico de infusão de plasma, por razões não imunológicas, em pacientes com crise de falcização (HUEHNS, DAVIES & BROZOVIC, 1981), tem despertado interesse. Entretanto, até agora, não existem estudos sobre a hipótese de DE CEULAER e col., 1981.

LARCHER e col., em 1982, consideraram inoportuna a especulação sobre um possível mecanismo de defeito do sistema complemento, visto que os estudos realizados até aquela data apresentavam resultados discrepantes, decorrentes, possivelmente, do uso de diferentes metodologias, da falta de estabelecimento da variação dos valores encontrados na população de crianças com doença falciforme, e, dos controles pareados por idade. Com o objetivo de identificar o estado de deficiência de complemento em uma população infantil com doença falciforme e em um grupo controle pareado por idade, eles mediram a capacidade dos soros de opsonizar o zimosan, a atividade funcional total da via alternativa e a relação das medidas funcionais e imunoquímicas do fator B. Encontraram uma incidência de defeito de opsonização de zimosan de 4,5% na população controle, enquanto na população com doença falciforme

forme esta incidência foi de 15% (11 em 72 pacientes). A média da atividade total da via alternativa foi significativa mente reduzida, comparada aos controles, em 9 dos 72 pacientes estudados, havendo uma correlação positiva entre a atividade funcional da via alternativa total e fator B. O fator B foi também significativamente reduzido quando medido por imunodifusão radial em 6 pacientes e 1 controle, não havendo, porém, correlação significativa entre as medidas funcionais e imunoquímicas do fator B. Quase 50% dos pacientes com deficiência na opsonização do zimosan possuíam atividade reduzida da via alternativa, porém nenhum tinha deficiência do fator B. Estudos seriados mostraram que estes achados foram persistentes. LARCHER e col., (1982), consideram paradoxal a afirmação de que defeitos funcionais da via alternativa do complemento, incluindo fator B (WILSON, HUGHES & LACHMAN, 1976; WILSON, THOMAS & SISSON, 1979; DE CEULAER e col., 1981), estejam associados a um defeito na opsonização do pneumococo (JOHNSTON, NEWMAN & STRUTH, 1973), em pacientes com doença falciforme, quando os níveis do fator B, medido por imunodifusão radial, foram normais (BJORNSEN, GASTON & ZELLNER, 1977). Propõem que um perfil laboratorial dos pacientes, para defeitos de opsonização e do complemento, possa ser utilizado na identificação dos indivíduos de maior risco para infecção pneumocócica.

Embora defeitos na opsonização dos pneumococos tenham sido consistentemente demonstrados em alguns pacientes com doença falciforme (WINKELSTEIN & DRACHMAN, 1968 ;

BJORNSON, GASTON & ZELLNER, 1977), isto não tem sido verdadeiro para microorganismos gram negativos (WINKELSTEIN & DRACHMAN, 1968; BJORNSON, GASTON & ZELLNER, 1977). Deste modo, os pacientes com doença falciforme podem ter um defeito de opsonização seletivo e a explicação para a sua elevada suscetibilidade para infecção por Salmonella sp pode ser diferente daquela para o pneumococo.

Os estudos de FIELD, OVERTURE & STRUNK (1981), sugerem que a opsonização da Salmonella sp é mediada predominantemente pela via alternativa ; as crianças avaliadas, não apresentavam nenhuma anormalidade desta via.

LUO & ROWLAND (1983) compararam a atividade bactericida e opsônica do soro de 12 pacientes com anemia falciforme com a de um "pool" de soros normais. Calcularam 4 índices, para cada soro do paciente: 1) índice de viabilidade de S. enteritidis na presença de cada soro; 2) índice de viabilidade de S. enteritidis na presença de cada soro e de neutrófilos humanos normais; 3) índice de bactérias ingeridas pelos neutrófilos; 4) índice de fagocitose. Apenas 1 dos 12 soros, mostrou resultados idênticos ao do "pool" de soros normais, sendo que nos 11 restantes, foram detectadas alterações importantes. A sobrevivência das bactérias na presença de soro de paciente foi 3 vezes maior do que na presença do soro normal. A fagocitose pelos neutrófilos na presença dos soros em teste foi de 10% do valor normal. A sobrevivência da bactéria ingerida foi 6 vezes maior. A acentuada redução do ín-

dice fagocitário é de grande importância visto que as *Salmonellas* ingeridas por neutrófilos são quase todas destruídas aos 30 minutos. A maior proporção de bactérias não ingeridas na presença do soro de pacientes, significa atividade bactericida menos eficiente.

Neutrófilos humanos normais, na presença de soro humano normal, destroem efetivamente a *S. typhimurium*. Este efeito é reduzido na presença do soro de pacientes e de soro normal inativado, indicando que a ingestão é ineficiente nos doentes e que o defeito está possivelmente na ativação do complemento. (HAND & KING, 1978; FIELD, OVERTURF & STRUNK, 1981).

É importante lembrar que o estudo da ontogenia do complemento é relativamente recente e durante o primeiro ano de vida, as crianças possuem valores inferiores aos dos adultos (YONEMASU e col., 1978; DAVIS, VALLATA & FORRISTAL, 1979; ADINOLFI, 1981) o que pode, em parte, explicar as discrepâncias nos resultados dos investigadores.

ANTICORPOS

Em relação às imunoglobulinas, níveis significativamente elevados de IgA sérica na anemia falciforme tem sido o resultado mais consistente (EVANS & REINDORF, 1968 ; CAGGIANO & HOLDEN, 1968; GAVRILIS, ROTHEMBERG & GUY, 1974 ;

BALLAS e col., 1980) e esta elevação torna-se aparente a partir dos dois anos de idade (MILLARD e col., 1982). Estes resultados são interessantes visto que as concentrações séricas de IgA, na criança normal, se elevam lentamente no decorrer da infância, alcançando valores semelhantes aos de adultos no final da idade escolar ou, até mesmo, na adolescência (STIEHM & FUDEMBERG, 1966; BERG & JOHANSSON, 1969; BELLANTI & HURTADO, 1975; MILLER, 1980; NASPITZ e col., 1982).

As concentrações séricas de IgG na doença falciforme são descritas como normais (EVANS & REINDORF, 1968), baixas em crianças jovens (ISICHEI, 1979) ou elevadas a partir dos 6 anos de idade (MILLARD e col., 1982) e em adultos (CAGGIANO & HOLDEN, 1968; GAVRILIS, ROTHEMBERG & GUY, 1974).

Em relação à IgM, os resultados obtidos têm revelado concentrações elevadas em crianças com anemia falciforme (EVANS & REINDORF, 1968) e diminuídas (SILLS & OSKI, 1979) ou normal em adultos (EVANS & REINDORF, 1968; CAGGIANO & HOLDEN, 1968; GAVRILIS, ROTHEMBERG & GUY, 1974, BALLAS e col., 1980), havendo, ainda, um estudo que demonstra níveis de IgM normais ou reduzidos (SEITANIDIS, MIHAS & ANGELOPOULOS, 1972). Foram demonstrados níveis de IgM baixos em pacientes com atrofia esplênica ou esplenectomizados, e elevados naqueles com baço normal ou aumentado (GAVRILIS, ROTHEMBERG & GUY, 1974). Entretanto, MILLARD e col., 1982, não encontraram nenhuma redução da IgM correlacionada com a idade dos pacientes.

É possível que o processo gradual de atrofia esplênica, em anemia falciforme, leve a que a produção de IgM seja feita em outras áreas do sistema retículo endotelial. Esses investigadores mostram que a partir dos 7 anos de vida, já são aparentes as anormalidades dos níveis séricos de imunoglobulinas encontrados em adultos com anemia falciforme.

Com relação à produção de anticorpos específicos, os indivíduos esplenectomizados e os pacientes com anemia falciforme, possuem uma incapacidade de sintetizar anticorpos para antígenos particulados administrados por via intravenosa (ROWLEY, 1950; SCHWARTZ & PEARSON, 1972). Eles demonstraram que crianças com anemia falciforme, responderam com títulos baixos de anticorpos para hemácias heterólogas, enquanto as crianças com traço falciforme (AS) e hemoglobinopatias S/β e SC, responderam com títulos normais. No entanto, níveis de imunoglobulinas séricas normais (SEITANIDIS, MIHAS & ANGELOPOULOS, 1972) e anticorpos normalmente formados após injeção intramuscular ou subcutânea de antígenos de Salmonella sp (ROBBINS & PEARSON, 1965), foram demonstrados na anemia falciforme.

A resposta de anticorpos para os polissacarídeos dos pneumococos na doença falciforme foi estudada preliminarmente por AMMAN e col., 1977. Eles administraram a vacina pneumocócica octavalente por via subcutânea em 77 pacientes com doença falciforme e, em 19 indivíduos asplênicos sem hemoglobinopatias e compararam suas respostas aos 82 contro-

les pareados por idade e sexo. O grupo com doença falciforme e o grupo asplênico sem hemoglobinopatia, responderam à imunização com a mesma magnitude do grupo controle, e a proteção conferida foi mantida por pelo menos dois anos. Estes resultados indicam, portanto, que a vacina promove proteção contra infecção por S.pneumoniae serotipo específico, em crianças com doença falciforme.

BUCHANAN & SCHIFFMAN, em 1980, estudaram a resposta humoral para a vacina pneumocócica polivalente em crianças com anemia falciforme, e, idades inferiores a 2 anos. As concentrações de anticorpos pós-vacina, para dez de doze serotipos, foram o dobro daquelas observadas antes de sua aplicação. As respostas foram semelhantes nas crianças entre 6 e 12 meses e entre 12 e 24 meses de idade. As crianças com idades entre 3 e 5 meses apresentaram uma resposta pobre em anticorpo, porém o reforço, aos 24 meses de idade, resultou em níveis semelhantes àqueles dos adultos, o que demonstra haver ocorrido formação de memória imunológica.

Entretanto, AHONKAI e col., (1979) demonstraram falha desta vacina em conferir proteção em alguns pacientes com doença falciforme e propuseram como explicação, o fato de nem todos os serotipos estarem contidos na vacina e também às baixas concentrações de alguns polissacarídeos tipo específico.

STEINBERG e col., (1978), estudaram a resposta clínica e sorológica de crianças com doença falciforme pa

ra a vacina bivalente do vírus Influenza A e, encontraram resposta elevada de anticorpo para ambos os antígenos, em mais de 90% dos indivíduos com doença falciforme. As respostas foram comparáveis àquelas de crianças normais, sugerindo que estas vacinas são protetoras contra o vírus da Influenza e suas complicações em doença falciforme .

Considerando-se que a faixa etária de maior risco para as infecções bacterianas, nas crianças com doença falciforme, coincide com a fase de maior importância para o desenvolvimento da resposta imune humoral e suas interações celulares, observa-se que na maioria dos estudos anteriormente citados sobre atividade opsonica sérica, falta uma abordagem mais profunda sobre a ontogenia dessas respostas, naquela faixa etária.

A produção de IgG pelo lactente só se torna consistente no final do primeiro semestre de vida, quando os elementos envolvidos nesta síntese alcançam um certo grau de maturidade e também os níveis de IgG de origem materna já se encontram reduzidos (MILLER, 1980; ANDERSON e col., 1981). Entre os 3 e 7 meses, a criança apresenta níveis muito baixos desta proteína, ocorrendo então a chamada fase de hipogamaglobulinemia fisiológica, elevando-se progressivamente os valores de IgG após este período, para alcançarem níveis de adultos, em torno dos 3 a 4 anos (BELLANTI & HURTADO, 1975; HAYWARD, 1983). Além disso, ANDERSON e col., (1981), demonstraram que a secreção das diferentes subclasses de IgG se dá em

períodos diversos. A IgG₁ e IgG₃ são bem demonstráveis nos primeiros 12 meses de vida, enquanto células produzindo IgG₂ e IgG₄ não alcançam consistentemente níveis de adultos, mesmo aos 2 anos de vida, idade máxima por eles estudadas. É muito provável que esta imaturidade se reflita de modo mais acentuado nas crianças com doença falciforme, através da suscetibilidade maior para certos agentes infecciosos, sabendo-se que há antígenos que despertam preferencialmente a resposta de anticorpos dentro de uma determinada subclasse de IgG. Assim, por exemplo, o ácido teicônico, polissacarídeo da parede bacteriana, induz principalmente anticorpos da subclasse IgG₂ (OXELIUS, 1974; PABST & KRETH, 1980). A deficiência congênita de IgG₂ e IgG₄ está associada com a não formação de anticorpos anti-ácido teicônico e anti H.influenzae, observando-se infecções recorrentes por esta bactéria (OXELIUS, 1974). Enquanto os pneumococos podem ser opsonizados através do efeito de anticorpos IgG₁, IgG₃ e IgM anti-capsular tipo específico, ou também, da ação combinada de anticorpo específico e complemento (PROVISOR & BAEHNER, 1980).

Considerados estes aspectos, de forma sucinta, podemos sugerir que as investigações envolvendo a função sérica opsônica deverão levar sempre em conta a faixa etária do grupo estudado, tendo em vista que as crianças com doença falciforme entre 6 meses e 4 anos de vida são aquelas de maior suscetibilidade às infecções por bactérias específicas.

ESTUDOS DOS FAGÓCITOS EM DOENÇA FALCIFORME

As células que se diferenciam no sentido de fagocitarem agentes infecciosos constituem o mais primitivo e ao mesmo tempo, o mais efetivo componente do sistema de defesa do organismo. Embora pareçam ter origem comum, os chamados "fagócitos profissionais" se distribuem em duas linhagens, os polimorfonucleares e os mononucleares.

Para que o processo de fagocitose tenha êxito, isto é, para que o microorganismo ou a partícula sejam ingeridos e destruídos, algumas etapas se fazem necessárias.

a) Quimiotaxia

O reconhecimento de bactéria opsonizada pelos fagócitos requer o movimento dirigido destas células para o local da infecção, o que é estimulado por uma variedade de fatores quimioatraentes, incluindo: componentes do sistema complemento C3a, C5a, C5b, C6, C7, linfocinas diversas, metabólitos do ciclo de lipoxigenação do ácido aracdônico, com especial destaque para os leucotrienos e também produtos bacterianos (ALTMAN, 1978; JENSEN, ESQUENAZE & CIANCIOLO, 1978 ; TURNER & LYNN, 1978; SNYDERMAN & GOETZL, 1981).

A quimiotaxia de leucócitos, fenômeno conhecido desde 1884 por METCHNIKOFF, é iniciada pela ligação do fator quimioatraente a receptores específicos na membrana ce

lular. A ocupação destes receptores induz alterações rápidas no potencial elétrico transmembranoso e se iniciam modificações nos níveis de nucleotídeos cíclicos e nos fluxos iônicos, aumenta a utilização de glicose e de oxigênio, a composição fosfolipídica da membrana se altera e se modificam as reações de transmetilação mediadas pela S.adenosilmetionina. Dentro de minutos, após o encontro com os fatores quimioatraentes, o fagócito altera sua morfologia e se orienta no sentido do gradiente quimiotático. Reorganização dos elementos do citoesqueleto, tais como as estruturas microtubulares e os filamentos de proteínas contráteis assim como dos receptores de superfície, é observada em células orientadas e parece ser requerida para a migração direcionada (GALLIN e col., 1978 ; STOSSEL, 1978; CRAMER, MILKS & OLAKIAN, 1980; SNYDERMAN & GOETZL, 1981; KLEIN, 1982c; SEGALL & SOOTHILL, 1983).

Um inibidor da migração estimulada dos polimorfonucleares "in vitro", foi descrito por AKENZUA & AMIENGHEME, em 1981, quando estudaram 38 crianças com anemia falciforme, com idades entre 2 e 13 anos e 18 crianças sem hemoglobinopatia com idades que variavam entre 4 e 11 anos. Todas as crianças com anemia falciforme foram estudadas durante a fase estável e 17 delas novamente estudadas durante as crises vaso-oclusivas. Nenhum defeito quimiotático foi demonstrado nas crianças na fase estável. Entretanto, durante as crises vaso-oclusivas, foi demonstrada redução na migração estimulada dos polimorfonucleares dos pacientes e controles quando o fator

químioatraente gerado resultava da incubação do soro dos pacientes em crise vaso-oclusiva com endotoxina de E.coli. Eles concluem que as crianças com anemia falciforme, apenas na crise vaso-oclusiva, desenvolvem um inibidor da migração dos PMN, um vez que o mesmo não é observado quando o estímulo é gerado a partir do soro de crianças na fase estável da doença (AKENZUA & AMIENGHEME, 1981).

b) Englobamento ou fagocitose propriamente dita.

Uma vez tendo chegado ao foco inflamatório, o fagócito precisa reconhecer para, em seguida, aderir à partícula a ser fagocitada. Este reconhecimento se faz principalmente através da ligação de receptores para Fc da IgG e para C3b, presentes na membrana dos fagócitos polimorfonucleares e mononucleares, com as estruturas complementares na superfície da bactéria ou partícula (GRIFFIN e col., 1975). Por tanto, a fagocitose é facilitada se a partícula houver sido previamente opsonizada. Os anticorpos da classe IgG, principalmente as subclasses IgG₁ e IgG₃ e fatores do sistema complemento, em especial o C3 ativado, são as opsoninas mais bem conhecidas (STOSSEL, 1974). O complemento pode se fixar à partícula, por ativação direta da via alternativa, como acontece por exemplo, com certos fungos como o zimosan, ou após a ligação do anticorpo à partícula, sendo os anticorpos da classe IgM, os mais eficientes na fixação do complemen-

to (STOSSEL, 1974). Outras opsoninas têm sido descritas, como a tuftsina, produzida basicamente no baço; a atividade opsonizante da proteína C reativa não é completamente aceita (KITCHENS, 1979; AIBENDER e col., 1982). Outra substância plasmática cuja atividade opsonizante vem sendo muito estudada, é a fibronectina, glico-proteína que facilita a eliminação de bactérias, imunocomplexos, restos celulares e plaquetas lesadas, pelo sistema reticuloendotelial (BARNARD & ARTHUR, 1983).

Tendo-se ligado à partícula, o fagócito começa a emitir pseudópodes ao redor de sua presa e estes pseudópodes terminam por se encontrarem, ocorrendo então a fusão da membrana plasmática. A partícula é englobada para dentro de um vacúolo denominado fagossoma, originário da invaginação da membrana celular. Estudos em macrófagos sugerem que o processo de fagocitose depende da presença de receptores em toda a membrana celular, que se ligam às estruturas complementares distribuídas por toda a superfície da partícula, resultando, assim, numa ligação progressiva, o que se propõe que seja um mecanismo semelhante ao de um "ziper" (GRIFFIN e col., 1975; GRIFFIN, GRIFFIN & SILVERSTEIN, 1976).

O contato da partícula com a membrana plasmática do fagócito inicia a série de eventos descritos no parágrafo anterior, que, no entanto, do ponto de vista bioquímico, somente agora está sendo um pouco compreendida. Sabe-se que um papel fundamental é desempenhado pela proteína que se liga à actina e que está associada à membrana plasmática (actin

binding protein), que inicia a polimerização da actina no citoplasma, a partir do sítio de ligação com a partícula. Em seguida, ocorre interação da actina com a miosina, o que resulta na contração da miosina na região do contato, levando à formação de pseudópodes estreitos. À medida em que os pseudó

godes se movem ao redor da partícula, novos contatos célula-partícula se fazem, novos estímulos para ativação da proteína que se liga à actina ocorrem e maior espalhamento dos pseudópodes pode ser observado. Experimentos em que a opsonina recobre apenas metade da partícula demonstram que somente meia partícula é englobada, falando a favor de que um estímulo seja gerado pelo contato entre o fagócito e a partícula a ser fagocitada (GRIFFIN e col., 1975; GRIFFIN, GRIFFIN & SILVERSTEIN, 1976).

Estudos adicionais demonstram que devido à imobilidade dos receptores de macrófagos para C3, eles são incapazes de se difundir, dentro da membrana citoplasmática, e, conseqüentemente, de promover a fagocitose de partículas ligadas com o C3. Além deste fato, a identificação prévia de uma linfocina que ativa os receptores C3 de macrófagos para fagocitose e a demonstração de que ela age pela liberação dos receptores de modo que eles podem se difundir dentro da membrana plasmática celular (GRIFFIN & GRIFFIN, 1979 e 1980), pareceu a estes investigadores que a interação inicial macrófago-linfocina ocorreria na sua superfície, via receptor linfocina específico. Demonstraram, desse modo, que a linfocina

exerce seus efeitos ligando-se primeiro a resíduos de fucose da glicoproteína na superfície do macrófago. Todos os ensaios que impediam a ativação da linfocina sobre os receptores C3 dos macrófagos, impediam também a mobilidade do receptor C3 induzida pela linfocina. Estes resultados sugeriram aos investigadores que a linfocina se liga a uma glicoproteína que contem fucose e que se encontra na superfície do macrófago e exercendo talvez, a função de receptor linfocina específico. Eles concluem ainda que, para um receptor ser capaz de promover fagocitose, ele deve se difundir dentro da membrana plasmática do macrófago (GRIFFIN & MULLINAX, 1981; GRIFFIN & MULLINAX, 1984).

Os estudos da função fagocitária em doença falciforme são ainda escassos. Em 1968, WINKELSTEIN & DRACHMAN observaram que os PMN de crianças com doença falciforme eram indistinguíveis dos PMN das crianças negras sem hemoglobino-patia de uma mesma comunidade. Com o mesmo intuito, JOHNSTON, NEWMAN & STRUTH (1973) estudaram a função fagocitária dos PMN de pacientes jovens (1-30 anos). Encontraram que os PMN dos doentes fagocitavam de forma eficiente os pneumococos opsonizados com quantidades máximas de anticorpo específico na presença do soro fresco de pacientes ou de controles.

Mais recentemente, HERNANDEZ e col., 1983, demonstraram que a fagocitose por PMN de pacientes com anemia falciforme na fase estável e em crise vaso-oclusiva, com idades entre 10 e 48 anos, apresentava uma taxa de ingestão

para óleo de parafina incubado com soro AB normal, semelhante a dos controles. Entretanto, isto não ocorreu quando as partículas foram incubadas com o soro de pacientes.

c) Destruição da bactéria ou partícula fagocitada

Após o englobamento completo da partícula pelo fagócito, grânulos citoplasmáticos, entre os quais, os lisossomas, se fundem com o fagossoma e liberam uma série de enzimas (lactoferrina, lisozima, mieloperoxidase, hidrolases ácidas), que contribuem para a morte e digestão da bactéria ou partícula ingerida (SEGALL & SOOTHILL, 1983).

No entanto, são os chamados mecanismos dependentes de oxigênio que hoje sabidamente desempenham o papel mais importante na atividade microbicida do fagócito. Durante o processo de fagocitose, pode-se observar um aumento acentuado, explosivo, do metabolismo oxidativo da célula, trazido pelo aumento do consumo de oxigênio e glicose. Quando o fagócito está em repouso, a utilização da glicose se faz sobretudo pela via de Embden-Meyerhoff, porém, após a fagocitose, o consumo de glicose no "shunt" das hexoses-monofosfato aumenta em cerca de 10 vezes, havendo formação de NADPH a partir de NADP. Ambos, NADPH e NADP, mais especialmente o primeiro, podem ser fontes de equivalentes redutores para o sistema oxidativo. Demonstra-se que o oxigênio é reduzido sequencialmente a super-óxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio

(H_2O_2) e radicais hidroxilas (OH^-), todos diretamente tóxicos para microorganismos. A mieloperoxidase, tendo o H_2O_2 como substrato, pode oxidar halogênios como o cloro e o iodo, tornando-os também tóxicos para o microorganismo fagocitado (STEIGBIGEL, LAMBERT & REMINGTON, 1974; JOHNSTON e col., 1975; QUIE & MILLS, 1979; KLEIN, 1982c; SEGALL & SOOTHILL, 1983).

Comparados com os indivíduos normais, o paciente com anemia falciforme tem um número elevado de leucócitos circulantes, sendo consequência da mobilização dos neutrófilos marginais intravascular, de modo que o "pool" de granulócitos circulantes está elevado às expensas do "pool" marginal, porém sem qualquer elevação no "pool" de granulócitos (BOGGS, HYDE & SRODES, 1973).

Entretanto, a atividade metabólica dos polimorfonucleares, incluindo a redução do NBT, o consumo de oxigênio, a atividade do "shunt" da hexose monofosfato, a produção de superóxido e a destruição intracelular bacteriana, têm sido descritos como reduzidos em pacientes homozigotos SS com história de infecção recorrente (DIMITROV e col., 1972; WAJIMA, 1975; FALCÃO, VOLTARELLI & BOTTURA, 1981), ou normal (STRAUSS, e col., 1976) e elevada capacidade bactericida na fase estável da doença (WAJIMA, 1975). A redução da capacidade bactericida nos pacientes com anemia falciforme foi semelhante ao grupo de indivíduos esplenectomizados cirurgicamente. Capacidade bactericida normal dos neutrófilos foi demonstrado em pacientes S/β (FALCÃO, VOLTARELLI & BOTTURA, 1981) assim como

em indivíduos com anemia falciforme sem história de infecção recorrente (DIMITROV e col., 1972).

Parece, portanto, que o defeito na atividade metabólica dos PMN existe, especialmente, naqueles pacientes com história de infecção repetida, ou relacionados apenas no momento da infecção. Entretanto, não está ainda estabelecido se este defeito tem dependência com a idade dos pacientes.

Verificam-se resultados muito variados quando se estuda a atividade metabólica destas células, que se mostra ora normal, ora deprimida, nos vários experimentos já citados.

O estudo conduzido por HERNANDEZ e col., em 1983, para avaliar vários aspectos da fagocitose, tais como, taxas de ingestão de partículas, de redução do NBT e atividade fungicida de PMN de pacientes com anemia falciforme, demonstraram que fatores séricos estavam envolvidos na redução de todos estes parâmetros. Contudo, embora houvesse uma diminuição da taxa de redução do NBT, mesmo na presença de soro normal, a atividade fungicida reduzida, foi atribuída a um defeito sérico, pelo fato desta função ter sido normal quando a candida foi opsonizada com soro AB-normal. Durante as crises vaso-oclusivas, não foi observado nenhum defeito destas funções. Concluem então que fatores séricos estão mais relacionados com a elevada suscetibilidade às infecções em doença falciforme, do que anormalidades nos fagócitos (HERNANDEZ e

col., 1983) e que a crise vaso-oclusiva não predispõe os pacientes com doença falciforme às infecções microbianas. Esta observação é consistente com o conceito clínico de que quando a crise de dor ocorre junto com infecção, é a infecção que precipita a crise através de um mecanismo pobremente definido que promove o fenômeno de falcização na microvasculatura.

ESTUDO DOS FAGÓCITOS MONONUCLEARES

As células maduras do sistema de fagócitos mononucleares são os monócitos, presentes principalmente no sangue periférico, e os macrófagos, encontrados basicamente em tecidos, como o fígado (células de Kupffer), rim (células mesangiais), pulmão (macrófagos alveolares), cérebro (células de microglia), osso (osteoclastos), baço e tecido conjuntivo. Os macrófagos são considerados células mais diferenciadas e mais ativas que os monócitos, grande parte delas conserva a capacidade migratória, sendo as formas sésseis, também chamadas de histiócitos (KLEIN, 1982a; KLEIN, 1982c).

O espectro de funções atribuídas a estas células tem se alargado progressivamente. Entre as funções consideradas não imunitárias, citam-se:

a) síntese de vários componentes do sistema complemento (C1, C4, C2, C3, C5, Fator B, Fator D, Properdina, C3b inativador e β 1H);

- b) síntese de transferrina;
- c) síntese de fibronectina;
- d) síntese de fatores da coagulação;
- e) síntese de interferons;
- f) síntese de enzimas, entre as quais a lisozima, collagenases, elastases, convertase da angiotensina, hidrolases ácidas;
- g) ingestão de quilomicra;
- h) eliminação de células lesadas ou mortas e partículas estranhas, entre outras (TERRITO & CLINE, 1976 ; CLINE e col., 1978; UCLA Conference, 1979; ZEMBALA, 1981; KLEIN, 1982a; KELLER, 1983; SEGALL & SOOTHILL, 1983).

Os fagócitos mononucleares têm ainda importante participação tanto nos mecanismos aferentes como nos mecanismos eferentes da resposta imune:

- a) processamento e apresentação de antígenos, essenciais para a síntese de anticorpos e reações mediadas por células T;
- b) interações com linfócitos, importantes na expressão das reações imunes mediadas por células;
- c) defesa contra microorganismos, principalmente parasitas intracelulares, obrigatórios ou facultativos, como o Mycobacterium tuberculosis, Mycobacterium leprae, protozoários, através do processo de fagocitose;
- d) envolvimento na imunidade antitumoral;

e) produção de fatores com atividades quimiotática para neutrófilos, ativadores de linfócitos, interleucina 1, entre outras funções (TERRITO & CLINE, 1976; CLINE e col., 1978; UCLA Conference, 1979; ZEMBALA, 1981; KLEIN, 1982a; KELLER, 1983; SEGALL & SOOTHILL, 1983).

Na doença falciforme, os estudos funcionais sobre este sistema celular são ainda restritos e pouco conclusivos, devido ao desenvolvimento recente de metodologia para este tipo de estudo e devido ainda à limitação na obtenção de material, já que os monócitos constituem 2 a 8% do "pool" de leucócitos circulantes e os macrófagos, são praticamente inacessíveis.

Há alguma evidência de que a hemólise crônica em pacientes com doença falciforme interfere com a capacidade dos macrófagos de tecidos fagocitarem e destruírem efetivamente a bactéria e que isto pode resultar em uma elevada frequência de infecções (GOLDE, 1975; STOSSEL, 1977). Não se sabe ainda se fatores semelhantes afetam os fagócitos mononucleares circulantes.

MAHONEY & FERNBACH, em 1983, estudaram várias funções do monócito em 18 crianças com doença falciforme, sem história de infecção recorrente. O grupo se constituía de 10 pacientes SS, 6 SC e 2 S/β talassemia. Eles demonstraram que nas condições experimentais testadas, a quimiotaxia, a fagocitose de Candida albicans e Candida pseudotropicalis,

a atividade fungicida, e, bactericida para S.aureus, assim como aderência e espalhamento foram semelhantes aos resultados obtidos em adultos normais.

ESTUDOS DA FUNÇÃO DOS LINFÓCITOS EM DOENÇA FALCIFORME

A análise de subpopulações de linfócitos T circulantes (ADES, HINSON & MORGAN, 1980) em 20 pacientes com doença falciforme (10 crianças e 10 adultos), mostraram que todos tinham pelo menos 50% menos células T do que os controles. Em 70% dos casos, estes pacientes possuíam porcentagens elevadas de células T supressoras. Os autores sugerem que estes resultados preliminares podem ser um mecanismo importante para explicar as infecções na doença falciforme, associado às desordens imunológicas previamente descritas e à hipofunção esplênica.

Outros estudos realizados por HERNANDEZ e col., em 1980, em 20 pacientes com anemia falciforme, demonstraram que não havia diferença significativa entre pacientes e controles na porcentagem média de roseta E e no seu número absoluto. Entretanto, a capacidade proliferativa dos linfócitos T, seguindo a estimulação pela fitohemaglutinina (PHA), estava reduzida em 50% e alguns dos pacientes mostravam anergia cutânea. Eles sugerem que comprometimento da imunidade mediada por célula é outro fator a ser incluído entre os defeitos nos mecanismos de defesa do hospedeiro com anemia falciforme.

HENDRIKS e col., 1984, estudaram em 22 pacientes com anemia falciforme e 25 indivíduos normais, subpopulações de células mononucleares e a capacidade proliferativa de linfócitos seguindo a estimulação com fitohemaglutinina (PHA) e concanavalina A (Con.A). Eles concluíram, a partir da pesquisa, que o número total de linfócitos em sangue periférico foi bem maior em pacientes, o número de linfócitos B, detectados por imunofluorescência de membrana foi normal e de linfócitos T identificados por roseta com eritrócitos de carneiro foi discretamente reduzido nos pacientes. Expressos em número absoluto, ambos T e B estavam elevados. A proliferação de linfócitos medida pela incorporação de timidina marcada seguindo a estimulação com PHA e Con.A foi normal. Após a estimulação com o mitógeno "Pokeweed" (PWM), a incorporação da timidina foi significativamente aumentada nos pacientes embora normal, quando expresso, como um índice de estimulação. O número de monócitos circulantes foi elevado nos pacientes e inversamente correlacionado com o número de reticulócitos. Estes resultados sugerem que a imunidade mediada por célula não mostra um defeito maior em pacientes com anemia falciforme (HENDRIKS e col., 1984).

ASPLENIA FUNCIONAL

Entre os diversos fatores de defesa estudados para elucidar as causas da elevada morbidade e mortalidade por infecção em crianças com doença falciforme, a função esplênica

ca tem recebido maior atenção e os resultados do conjunto das investigações têm se revelado mais consistente.

O baço é o órgão linfóide secundário que mais precocemente se desenvolve. No início da vida exerce um papel fundamental não somente como sítio de fagocitose e destruição de bactérias e células lesadas, mas também é um importante local de produção de anticorpos (KITCHENS, 1979 ; MILLER, 1980). Ao nascimento, quando os linfonodos e o tecido linfóide associado às mucosas ainda são hipodesenvolvidos, o papel imunitário do baço é fundamental, passando progressivamente a ser compartilhado com os outros órgãos linfóides secundários, à medida em que estes se desenvolvem. Daí as consequências graves que podem advir de uma esplenectomia para a criança de baixa idade.

Pelos 6 meses de idade, a maioria das crianças com anemia falciforme tem um aumento do baço à palpação. Progressivamente, deixa de ser palpável, sendo reduzido a um remanescente fibro-sideroso em consequência dos episódios repetitivos de vaso-oclusão e infartos, um fenômeno denominado 'auto-esplenectomia' (DIGGS, 1973 ; O'BRIEN e col., 1976; ZAGO & BOTTURA, 1983).

PEARSON, SPENCER & CORNELIUS, em 1969, motivados pelos achados de corpúsculos de Howell-Jolly e grânulos contendo ferro (siderócitos) em preparações do sangue periférico de crianças com anemia falciforme, estimaram a função

esplênica desses pacientes pela infusão intravenosa de partículas de colóide sulfúrico marcadas pelo ^{99m}Tc . Em 11 das 12 crianças estudadas não foi detectado nenhuma captação pelo baço das partículas de colóide marcadas. No grupo controle, constituído por crianças heterozigotas para HbS, hemoglobino patias SC e S/β e crianças normais, a concentração esplênica do colóide sulfúrico foi facilmente demonstrada. Criaram então o termo asplenia funcional, e a definiram como um defeito da atividade reticuloendotelial do baço, aumentado à palpação (PEARSON, SPENCER & CORNELIUS, 1969).

A função esplênica foi restaurada pela transfusão de hemácias normais em 5 crianças com baço aumentado. Três crianças, cujos baços foram julgados como atróficos permaneceram funcionalmente asplênicos após transfusões de hemácias. (PEARSON e col., 1970). Estes estudos documentam que a função do baço é reversível pela transfusão de hemácias normais, em quantidades suficientes para reduzir pela metade o número de células irreversivelmente falcizadas. Contudo, esta reversibilidade é gradualmente perdida, demonstrando a incompetência do baço como filtro biológico para partículas do tamanho do colóide sulfúrico, 1 micra. Entretanto, nenhuma criança, das 8 estudadas, restabeleceu a função esplênica após transfusão de plasma. A correção da função esplênica pela infusão de eritrócitos normais, sugere que o fenômeno de falcização de alguma forma interfere como o fluxo sanguíneo, através dos sinusóides da polpa esplênica revestidos por macrófagos.

A perda da função reticuloendotelial do baço nestes pacientes, deve resultar da sobrecarga dos sinusóides esplênicos com células falcizadas e subsequentes infartos. O fluxo sanguíneo torna-se lento, e o ambiente relativamente anóxico e acidótico estimula a falcização intravascular. O aumento da viscosidade sanguínea e a falta de plasticidade das células falcizadas necessárias para transitar no leito reticular dos sinusóides esplênicos, obstruem o fluxo sanguíneo ao nível pré-sinusoidal. Como resultado, o sangue arterial é desviado para neo-formações arteriovenosas intraesplênicos e, desta maneira, dos macrófagos que revestem os sinusóides da polpa esplênica (PEARSON e col., 1970).

Durante os primeiros meses de vida, o baço, na criança com doença falciforme, tem tamanho e função normal. Adquirida entre os 6 meses e 3 ou 4 anos de vida, a asplenia funcional ocorre quando o nível de hemoglobina fetal cai abaixo de 20%. É muito provável que a ocorrência de asplenia funcional, assinalada pelo aparecimento de um baço palpável, corpúsculos de Howell-Jolly nos eritrócitos, "Pits" ou crateras na superfície da membrana dos eritrócitos, demonstráveis pela microscopia de contraste de interferência (Nomarski optics) e captação isotópica anormal do baço, marquem o início do período de maior risco para infecção bacteriana severa (PEARSON, SPENCER & CORNELIUS, 1969; PEARSON e col., 1970; O'BRIEN e col., 1976).

Recentemente, um método não invasivo, não iso-

tópico, foi introduzido para avaliação da função esplênica , pelo exame de hemácias circulantes, usando microscópio de interferência em contraste de fase (KAYDEN & BESSIS, 1970). Com esta técnica pode ser mostrado que cerca de 20% das hemácias de pessoas asplênicas contêm um ou mais "pits", enquanto menos de 1% das hemácias de indivíduos normais contêm estes "pits" (HOLROYDE, OSKY & GARDNER, 1969).

Em 1979, PEARSON e col., avaliaram a função esplênica de crianças e adolescentes com anemia falciforme e, indiretamente, estudaram a capacidade de fagocitose por parte do sistema reticuloendotelial (SRE) deste órgão. Observaram, por microscopia de interferência em contraste de fase, a superfície de eritrócitos circulantes, quanto à presença de "pits" ou crateras e encontraram uma porcentagem significativamente maior de células com depressões em membranas entre os pacientes com níveis de HbF inferior a 20%, guardando portanto uma relação inversa. Nas crianças entre 3 meses e 12 meses de vida, o número destas células aumentava no decorrer do tempo (de 5% passava para 10%), e entre 6 e 11 anos de vida havia pouca flutuação no seu número . Entre os pacientes com genótipos AS, S/β e PHHbF a porcentagem de "pits" estava próximo ou dentro da variação normal, enquanto nos pacientes com genótipo SC, os valores estavam acima do normal, porém mais baixos do que os encontrados em crianças com genótipo SS, de mesma idade. Estes dados falam a favor de um tempo de depuração de hemácias lesadas mais prolongado entre crianças com genótipo SS a partir

dos 5 meses de vida ou com início mais tardio aos 36 meses de vida (média 13 meses) como foi claramente demonstrado por O'BRIEN e col., 1976, quando seguiram a função esplênica de 20 recém-nascidos com genótipo SS. Estes resultados refletem uma hipofunção do SRE, a nível do baço.

Os resultados de ROGERS, SERJEANT & SERJEANT, (1982) em 130 crianças com anemia falciforme entre 0 e 4 anos de vida, demonstram uma contagem média elevada de "pits" relacionadas diretamente com a idade. A contagem seriada de "pits" foi igual ou maior de 10% em 23% das crianças com 01 ano de idade, em 42% das crianças com 2 anos e 52% nas crianças com 3 anos, sendo que na idade de 51 meses a média foi 17.5% comparado com uma média de 18.1% em pacientes esplenectomizados. Todas as infecções severas ocorreram naquelas crianças cuja contagem aumentou aos 12 meses de idade. A explicação proposta por eles é que se a função esplênica é reduzida antes do primeiro contacto com o germe invasor, a falha de resposta em anticorpo dependente do baço pode resultar em uma depuração muito deficiente do microorganismo pelo fígado. Contudo, se já existem anticorpos por um contacto prévio com o microorganismo ou, resultante de imunização ativa ou passiva, o microorganismo pode ser rapidamente eliminado da circulação pelo fígado, mesmo na ausência de um baço funcionante. Para esta explicação os autores se basearam nos trabalhos de SHULKIND, ELLIS & SMITH, (1967).

Os resultados de CASPER e col., 1976; KIM e

col., 1980; ZAGO & BOTTURA, 1983, confirmam as conclusões anteriores de PEARSON e col., 1979, utilizando metodologia semelhante.

O risco de infecção imposto pela hemoglobina S faz lembrar aquele associado ao estado asplênico. Ambos, doença falciforme e asplenia compartilham um risco elevado de infecção grave por S.pneumoniae, H.influenzae e meningococos, em crianças abaixo de 3 ou 4 anos de vida.

BALFANZ e col., 1975, relata que a mortalidade por infecção fulminante pós-esplenectomia varia de 50% - 80%. Em mais de 50% dos casos, o organismo responsável foi o S. pneumoniae. Os outros patógenos importantes são H.influenzae, N.meningitidis, Staphylococcus aureus, streptococos e pseudomonas. Os bacilos entéricos são raramente envolvidos embora as infecções com E.coli sejam descritas. Portanto ambos desenvolvem o mesmo comportamento clínico frente a uma infecção bacteriana.

Considerando que o baço constitui cerca de 25% da massa linfóide total do corpo, as consequências da asplenia são determinadas pela extensão, na qual o tecido retículo endotelial extra-esplênico assume a função esplênica (LIKHITE, 1977).

Em coelhos, com anticorpos pré-formados para antígenos do pneumococo, os pneumococos marcados com ¹²⁵I foram efetivamente eliminados pelo fígado. Em coelhos não imuni

zados, os pneumococos oriundos do sangue são eliminados seletivamente pelo baço (SCHULKIND, ELLIS & SMITH, 1967). Disto resulta que a fagocitose eficiente dos pneumococos e outros organismos encapsulados é dependente da opsonização preliminar com anticorpos específicos e a última observação faz sugerir que o baço gera a síntese inicial de anticorpos em animais expostos pela primeira vez ao pneumococo. As cápsulas polissacarídicas recobrando os pneumococos, meningococos e H.influenzae, impedem a sua fagocitose (FULGINITI & SIEBER, 1980).

A circulação do baço, proporciona um contacto íntimo entre os antígenos oriundos do sangue com uma grande massa de tecido imunologicamente competente, o que o torna idealmente adequado para efeito rápido local da resposta imune. Em concordância com esta proposta de atividade imunológica do baço, está a observação de que indivíduos esplenectomizados demonstram pouca ou nenhuma resposta humoral para antígeno particulado administrado por via intravenosa, enquanto que seguindo a administração subcutânea de antígeno solúvel estas respostas são normais (ROWLEY, 1950).

Analizadas em conjunto, estas evidências experimentais falam a favor de que existe uma relação temporal muito consistente da asplenia funcional da criança com doença falciforme e suscetibilidade as infecções seletivas por bactérias encapsuladas, dado o seu papel central na expressão da resposta imune para estas bactérias.

TUFTSINA EM DOENÇA FALCIFORME

Acredita-se que o baço está ativamente envolvido na síntese e liberação de um tetrapeptídeo (Thr-lys-Pro Arg) chamado tuftsina, que age diretamente sobre os fagócitos (CONSTANTOPOULOS, NAJJAR & SMITH, 1972). A deficiência de tuftsina tem sido demonstrada em pacientes esplenectomizados (CONSTANTOPOULOS e col., 1973) e em pacientes com doença falciforme (SPIRER e col., 1980), cujos resultados são concordantes com os de NAJJAR, (1975) e em pacientes com infecções severas (NAJJAR, 1975 e 1978). Estes estudos, propõem que a deficiência de tuftsina compromete a função fagocitária dos polimorfonucleares e macrófagos e nos pacientes com doença falciforme contribui para a maior suscetibilidade às infecções graves.

OBJETIVOS

A criança com doença falciforme apresenta elevada morbidade e mortalidade por infecções bacterianas específicas, cujo início é marcado pelo aparecimento de hipofunção do sistema reticuloendotelial à nível do baço na faixa etária de 6 meses a 4 anos. Nesta idade, a criança vive uma fase de grande importância para o desenvolvimento da resposta imune humoral e suas interações celulares, tendo a função sérica opsonica relevante papel na defesa contra microorganismos encapsulados. Este período de vida da criança com

doença falciforme, pode coincidir também, com a hipogamaglobulinemia transitória (dos 3 meses aos 7 meses) e ainda com um hipodesenvolvimento dos outros órgãos linfóides secundários. Paradoxalmente, a maioria destas crianças expressam boa resposta para a vacina dodecavalente preparada com polisacarídeos de serotipos específicos do pneumococo. Consequentemente, a interferência dessa doença no amadurecimento progressivo do sistema imune poderia se refletir principalmente na função fagocitária, uma vez que a participação dos fagócitos é de grande importância tanto nos mecanismos aferentes como eferentes da resposta imune. Considerados estes aspectos e os resultados escassos e conflitantes do ponto de vista imunológico, encontrados na literatura, foi desenvolvido o presente trabalho com o objetivo de verificar se há ou não alteração da função fagocitária em crianças com doença falciforme. Os estudos envolvem os seguintes aspectos:

1- Estudo da atividade quimiotática dos monócitos periféricos.

2- Estudo da atividade quimiotática dos polimorfonucleares periféricos.

3- Estudo do índice fagocitário e da capacidade fagocitária dos monócitos periféricos para :

a) eritrócitos de carneiro previamente incubados com anticorpos de coelho anti-eritrócito de carneiro de classe IgG, para detectar a presença de receptores para Fc da IgG;

II - METODOLOGIA

b) partículas de zimosan previamente incubadas com soro humano fresco, para investigar a presença de receptores para C3.

4- Estudo da função esplênica através da contagem de "Pits", em hemácias.

1. SELEÇÃO DE PACIENTES

O grupo de pacientes foi constituído de 37 crianças com doença falciforme, das quais 27 possuíam o genótipo SS, 5 S/ β^0 talassemia, 2 S/ β^+ talassemia e 3 SC. O grupo de doentes SS, 18 do sexo feminino e 9 masculino, encontrava-se na faixa etária entre 1a 3m até 13 anos. O grupo S/ β^0 talassemia, 4 do sexo feminino e 1 masculino, com idades entre 4 e 8 anos de vida. O grupo S/ β^+ , 1 de cada sexo, com idades de 6 e 4 anos e o grupo SC constituído por 2 indivíduos do sexo feminino e 1 masculino, com idades de 7, 9 e 3 anos respectivamente.

Estas crianças são acompanhadas pelo setor de Hematologia Infantil do Departamento de Pediatria - FCM UNICAMP, desde a época em que foi diagnosticada a doença falciforme.

Selecionaram-se pacientes na fase estável da doença e que não houvessem recebido transfusão no período de 2 meses precedentes ao estudo.

Todos os pacientes e seus familiares receberam explicações verbais sobre a natureza e objetivos da pesquisa.

1.1 EXAMES COMPLEMENTARES REALIZADOS

Todos os exames foram realizados no laboratório de Hematologia do Departamento de Patologia Clínica da Faculdade De Ciências Médicas - UNICAMP. O diagnós-

tico de S/ β^0 talassemia foi confirmado pelos valores hematimétricos, eletroforese de hemoglobina em gel de amido com tampão Tris-EDTA-Borato pH.8,9 (DACIE, LEWIS & WHITE, 1975), e em gel de ágar com tampão citrato pH.6,1, e em todos os casos, estudo familiar, pela detecção de um gen β talassêmico em um dos progenitores.

O número de eritrócitos, a concentração de hemoglobina e o hematócrito, foram determinados em um contador automático (COUNTER COULTER modelo SSn). O volume corpuscular médio (VCM) e hemoglobina corpuscular média (HCM), calculados a partir destes dados.

A presença de hemoglobina S foi confirmada pela determinação da solubilidade em tampão fosfato 2.49 mol /l contendo ditionito (ZAGO, COSTA & BOTTURA, 1982) e pela prova de falcização positiva (DACIE, LEWIS & WHITE, 1975).

A determinação de hemoglobina A₂ foi realizada por eluição de hemoglobinas após eletroforese em fitas de acetato de celulose (WEATHERALL & CLEGG, 1972).

A hemoglobina fetal foi medida pelo método da desnaturação alcalina (PEMBREY, MAC WADE & WEATHERALL, 1972).

Os reticulócitos foram calculados pelo método convencional com azul brilhante de cresil (DACIE, LEWIS & WHITE, 1975).

O diagnóstico de dupla heterozigose para hemoglobina S e C foi estabelecido, pela demonstração das duas hemoglobinas, por eletrólise de hemolisado e pela ausência de ou

tras hemoglobinas.

Nos quadros 1 e 2 estão relacionados dados laboratoriais destes grupos de pacientes. A eletroforese em gel de amido e em gel de ágar revelou nos grupos de paciente com $S\beta^0$ talassemia e anemia falciforme, a presença predominante de hemoglobina S, acompanhada de pequenas quantidades de hemoglobina fetal (HbF) e hemoglobina A_2 (HbA₂).

2. SELEÇÃO DO GRUPO CONTROLE

O grupo controle foi constituído de 67 crianças, selecionadas, clinicamente sadias, pareadas por idade e sexo ao grupo de pacientes, das quais foram colhidos 15 ml de sangue de veia periférica.

Antes da colheita do material, realizou-se um breve interrogatório clínico sobre antecedentes patológicos pessoais, especialmente sobre infecção, exame físico geral e foi dada explicação à família sobre os objetivos da pesquisa e solicitada sua permissão.

3. MATERIAL DE LABORATÓRIO

- Anticorpo de Coelho de tipo 7S anti-eritrócito de carneiro (Instituto Adolfo Lutz, SP, Brasil - Lote 416. Título Kolmer 1:10.000; T.Kolmer modificado 1:10.000 (1U). Título aglutinante para hemácias de carneiro 1:160; Título cor-

QUADRO I - Características hematológicas dos pacientes homozigóticos com Hemoglobinopatia SS.

PACIENTE	IDADE	SEXO	Hb g/dl	GV x10 ¹² /l	HTc %	VCM (fl)	HCM (pg)	HbF %	HbA ₂ %	
01	GR	5a	M	7,8	2,20	0,23	103	35,4	5,7	2,6
02	VSP	6a	M	7,8	2,54	0,24	96	30,8	1,3	2,4
03	SAO	6a	F	6,3	1,95	0,20	104	32,3	2,5	2,3
07	JAM	11a	F	8,9	2,82	0,25	86	32,3	9,1	2,3
08	MAP	13a	F	7,4	2,61	0,19	71	28,2	2,0	2,6
09	RCS	11a	F	8,3	2,53	0,23	91	32,9	8,6	2,3
10	CRL	1a3m	F	5,8	2,0	0,16	80	29	8,2	1,9
11	RAS	13a	F	8,6	2,70	0,26	98	32	7,5	1,5
12	VM	1a9m	F	10,4	3,27	0,32	99	32	18,7	1,6
13	JFS	3a	F	8,2	2,64	0,26	99	30,7	12,3	2,3
14	GCS	6a	F	8,1	2,90	0,26	90	27,7	7,6	2,1
15	JCS	5a	F	7,8	3,20	0,23	73	24,4	2,4	2,2
16	RAM	6a9m	M	9,2	3,13	0,26	81	29,2	4,7	3,0
17	FAM	5a	F	10,8	4,03	0,32	79	26,6	11,7	1,7
18	MCC	11a	F	7,9	2,88	0,24	81	26,4	15,9	2,5
19	LFA	4a	F	10,1	3,09	0,31	101	32,7	20,2	1,9
20	CAD	7a	M	8,4	3,58	0,25	69	24	1,5	2,7
23	OAS	11a	M	8,2	2,56	0,24	95	33,1	8,3	2,2
24	DCS	7a	F	6,2	2,17	0,19	91	31,6	3,2	2,0
25	ACS	4a	M	7,6	3,59	0,23	67	23,1	5,6	2,4
27	CAM	4a	M	9,7	3,45	0,27	77	36,7	2,7	2,8
29	LPS	7a	F	7,9	2,33	0,24	103	33	9,2	2,3
32	VSL	6a	F	6,3	2,14	0,19	91	33	3,1	1,8
33	FAC	8a10m	F	7,3	2,44	0,21	90	33	5,4	2,0
34	FAC	2a7m	M	8,1	3,20	0,23	76	27,6	5,7	2,8
35	JPS	3a	F	6,8	2,34	0,21	95	32,2	8,2	2,4
36	CPS	10a	M	8,3	2,97	0,24	86	30,8	10,1	2,7

QUADRO II - Características hematológicas dos pacientes com dupla heterozigose para hemoglobinopatia S, β^0 , β^+ e C.

PACIENTE	IDADE	SEXO	Hb g/dl	GV $\times 10^{12}/l$	HTc %	VCM (fl)	HCM (pg)	HbF %	HbA ₂ %
S/ β^0 TALASSEMIA									
04 SCL	6a	F	7,0	3,25	0,24	72	22,1	3,9	4,25
06 ARC	6a	F	9,5	4,05	0,29	71	23,3	1,5	3,7
26 APR	4a	F	7,7	3,27	0,23	70	24,2	12,4	3,6
28 ECV	11a	F	10,1	4,19	0,27	65	24,6	6,7	3,6
31 DSC	8a	M	9,1	4,63	0,29	62	19,2	2,75	3,7
S/ β^+ TALASSEMIA									
21 RPS	6a	F	10,3	5,15	0,31	60	20,4	18	5,1
22 RPS	4a	M	9,4	5,0	0,28	56	18,5	2,3	4,0
SC HEMOGLOBINOPATIA									
30 IJS	9a	M	9,7	3,68	0,31	85	25,7	0,35	-
37 CCS	3a	F	9,5	4,15	0,27	67	25,2	3,1	-
38 VCS	7a	F	10,5	4,09	0,30	76	28,1	1,7	-

respondente a 50% de hemólise 1:2000).

- Bálsamo Sintético do Canadá (Riedel de Haën Ag. Seelze, Hannover, Alemanha.

- Butanol (Merck S.A.Indústrias Químicas, RJ, Brasil).

- Câmaras de quimiotaxia tipo Boyden modificadas (executadas em lucite no laboratório de desenvolvimento e aplicação de laser. Departamento de estado sólido. Instituto de Física Gleb Wataghin - UNICAMP) por especial atenção do Professor Dr. Jorge Humberto Nicola.

- Corante de Leishman (E.Merck, Darmstadt).

- Endotoxina bacteriana (Lipopolissacarídeo B, E.coli 0.26B.6, preparado no laboratório do Departamento de Imunologia e Microbiologia. Instituto de Biologia UNICAMP.

- Eosina (eosin gelblich - 1345 CINr 45-380 SNr 881).

- Eritrócitos de carneiro (obtidos de animais do Departamento de Imunologia e Microbiologia Instituto de Biologia - UNICAMP, e conservados à 4°C em solução de Alsever estéril).

- Etanol absoluto (Merck S.A., Indústrias Químicas, RJ, Brasil).

- Gradiente de Ficoll - Hypaque com densidade 1076 (Ficoll 400 - Pharmacia Fine Chemical, Uppsala, Suécia ; Hypaque Products Inc., New York, EUA).

- HBSS - Solução salina balanceada de Hanks (preparada no laboratório do Departamento de Imunologia e Mi-

crobiologia - UNICAMP).

- Hematoxilina de Harris (Sigma Chemical Co., Saint Louis, EUA).

- Heparina (Liquemine - 5.000 UI/ml - Roche Produtos Químicos e Farmacêuticos S.A., RJ, Brasil).

- Membranas de filtro Millipore - SSWP (poros de 3 μ) e SCPW (poros de 8 μ), SP, Brasil.

- Metanol (J.T. Baker, Richardson Merrel/Moura Brasil S.A., SP, Brasil).

- Siliconização de vidraria: Polidimetilsiloxa ne 360/350 CS fluido de silicone (Dow Corning do Brasil Ltda).

- Tubos de Leighton (Vidrolabor - Indústria e Comércio de vidros de Laboratório Ltda., SP, Brasil).

- Xilol (Merk S.A., Indústrias Químicas, RJ , Brasil).

- Zimosan, preparado a partir de fermento Fleischman - fermento fresco de pão, no laboratório do Departamento de Imunologia e Microbiologia - Instituto de Biologia-UNICAMP.

4. TÉCNICAS LABORATORIAIS

4.1 - PREPARO DO LIPOPOLISSACARIDEO DE E.COLI (026:B6)

A obtenção do lipopolissacarideo extraído de E. Coli (026:B6) realizou-se, seguindo-se a técnica de extra-

ção pelo fenol, descrita por WESTPHAL e col. (1965).

Na preparação deste antígeno, utilizou-se uma cepa lisa de E.coli (026:B6), cultivada a 37°C em um fermentador (Microfirm Fermentor, New Brunswick Scientific Co., Ing Edison, NI, USA), durante 24 horas. O volume de suspensão bacteriana, coletado do fermentador foi centrifugado a 10000 RPM por 15 minutos e lavado três vezes em água destilada e o precipitado liofilizado. De cada 10 litros de cultura, obtiveram-se 5,2g de pó seco.

Obtiveram-se 10g de bactéria em pó que foram suspensas em 160 ml de água destilada a 65°C e acrescentado a 265 ml de fenol 75% a 90°C. Após resfriamento até 5°C, o material foi centrifugado a 4000 RPM, durante 30 minutos. Em seguida, a fase aquosa foi decantada e a fase fenólica novamente tratada com 160 ml de água a 68°C, resfriada a 5°C e centrifugada a 4000 RPM por 30 minutos.

As duas fases aquosas foram dialisadas contra água destilada, concentradas até 10 ml em seguida, centrifugadas para remoção do material insolúvel. Após a centrifugação, procedeu-se à precipitação com 6 volumes de álcool etil ou acetona misturada com um pequeno volume de solução alcoólica saturada com acetato de sódio (1g de acetato de sódio se dissolve em 19 ml de álcool). Em seguida, o material foi centrifugado a 10.000 RPM por 30 minutos e o sedimento, lavado com álcool e acetona, e seco no vácuo. Este procedimento foi repetido três vezes, para eliminar o ácido nucleico.

A dosagem de polissacarídeos foi realizada pelo método de DUBOIS e col., (1956) e a dosagem de proteínas pelo método de LOWRY e col., (1951). O rendimento foi de 14%, isto é, de 5,2g de bactéria obteve-se 0,730g de lipopolissacarídeo. O teor de proteínas nesta preparação foi de 10.3 µg/l.

A análise da atividade biológica desta preparação foi comparada a de uma preparação de endotoxina bacteriana de E.Coli 0.26:B.6, Difco Laboratories, Detroit, EUA, através da sua incubação em variadas concentrações, com soro normal, no teste "in vitro", da geração de fatores quimioatraentes para fagócitos.

4.2 - PREPARO DO ZIMOSAN

Preparado a partir do fermento Fleischman -fermento fresco de pão, seguindo-se a técnica descrita por PILLEMER e col. (1956). 250g de fermento Fleischman foram dissolvidas em 100 ml de salina 0.15M, pH7,15 e aquecido em banho-maria fervente durante 15 minutos, com agitação contínua. Após resfriamento, a suspensão foi lavada três vezes com 100 ml de acetona. O material foi colocado em um dessecador a vácuo por uma noite. Em seguida, pesado e tratado com HCl 0,02N por 30 minutos a 75°C, usando-se 10 ml da solução para 1g do material. Esta mistura foi centrifugada e o sedimento lavado três vezes com água destilada, duas vezes com álcool a 96% e uma vez com etanol absoluto. Após estes procedimentos, colocado em dessecador a vácuo e após 1 noite, pesado.

Todas as lavagens foram realizadas a 4°C a 2000 RPM, durante 15 minutos, com a finalidade de remover os carboidratos solúveis e as gorduras.

A amostra inicial de 250g de fermento fresco rendeu 58g de Zimosan.

Para uso, a suspensão de Zimosan foi preparada a partir de 300 mg deste material em 20ml de salina 0,15M e aquecida em banho-maria fervente por 1 hora, com agitação manual contínua.

Após centrifugar a 3000 RPM por 30 minutos, a 4°C o precipitado foi resuspenso em salina 0,15 M e autoclavado a 120°C durante 1 hora. Suspensões contendo 1×10^7 partículas por ml foram armazenadas de modo estéril a 4°C.

4.3 - PREPARO DE HBSS

Preparada a partir da solução estoque 10 vezes concentrada (OLIVEIRA LIMA & DIAS DA SILVA, 1970) de acordo com a fórmula abaixo e esterilizada por filtração em membrana de millipore.

Solução A:	NaCl	80g
	KCl	4g
	CaCl ₂	1,4g
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	2,g
	Água Destilada	400 ml

Solução B:	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	1,52g
	KH_2PO_4	0,6g
	Glicose	10g
	Vermelho fenol 1%	16 ml
	Água Destilada	400 ml

As soluções A e B foram misturadas sob agitação e o volume completado para 1 litro. Para uso, esta solução foi diluída 1:10 em água destilada e tamponada pela adição de 1,25% de solução de NaHCO_3 a 2,8% e armazenada de modo estéril a -20°C .

4.4 - GRADIENTE DE FICOLL - HYPaque

36,4 g de Ficoll (Ficoll 400 - Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suécia) em 480 ml de água destilada, foi misturado com 120 ml de hypaque 50% (Hypaque Winthrop Products Inc New Your, USA). A densidade específica deste gradiente é de 1076 g/ml. Para esterilização, utilizou-se o vapor fluente a 120°C , durante 30 minutos, e armazenado de forma estéril em alíquotas de 8 ml a 4°C , protegido da luz.

4.5 - OBTENÇÃO DE LEUCÓCITOS MONONUCLEARES

O sangue, imediatamente após coleta asséptica com heparina (aproximadamente 100 U de heparina por ml de sangue), foi deixado sedimentar em temperatura ambiente por 1 hora. O plasma rico em leucócitos, juntamente com a porção superior da coluna de hemácias, foram centrifugados por 10 min a

200 x g e o botão, em seguida, suspenso em 2 ml de solução salina balanceada de Hanks. Esta suspensão foi colocada sobre um gradiente de Ficoll-Hypaque com densidade de 1.076 e centrifugada a 250 x g por 30 min (para separação de leucócitos mononucleares e polimorfonucleares). Os leucócitos mononucleares foram cuidadosamente removidos do gradiente e lavados três vezes com solução de Hanks, sempre aquecida a 37°C. Em seguida, foram suspensos em solução de Hanks e ajustada a concentração para 2×10^6 células/ml. Vinte a 40% destas células eram monócitos. Tendo-se observado 2 a 3% de contaminação com polimorfonucleares.

4.6 - OBTENÇÃO DE LEUCÓCITOS POLIMORFONUCLEARES

O sangue, colhido do mesmo modo como no item 4.5, foi deixado sedimentar em temperatura ambiente, por 1 hora. O plasma rico em leucócitos, plaquetas e poucos eritrócitos foi transferido para um tubo de vidro 100 x 12 mm e centrifugado a 200 x g por 10 minutos e o botão, em seguida, lavado 3 vezes com solução de Hanks, foi ajustada para 2×10^6 cel/ml.

4.7 - QUIMIOTAXIA

4.7.1 - Obtenção do fator quimiotático

"Pools" de soros de adultos normais e individualmente os soros de pacientes, incubados isoladamente por 30 min, a 37°C, com um lipopolissacarideo de E.coli (LPS), dissolvido em solução de Hanks aquecida a 37°C, numa concentração de 100 µg/ml, foram utilizados na geração de fator quimio

tático para monócitos e polimorfonucleares (10% de soro, na diluição final).

4.7.2 - Ensaio Quimiotático

O método utilizado constitui uma adaptação da técnica descrita por BOYDEN, 1962. No compartimento inferior da câmara de quimiotaxia (câmara de BOYDEN modificado), colocou-se 0,2 ml do fator quimiotático (4.7.1) e no compartimento superior, 0,5 ml da suspensão celular, respectivamente para monócitos e polimorfonucleares (4.5 e 4.6) sendo os dois compartimentos separados entre si por uma membrana de filtro de ester de celulose, com poros de 8 micra para estudo de quimiotaxia de monócitos e de 3 micra para os polimorfonucleares.

Como controle para a determinação da migração espontânea, colocou-se apenas solução de Hanks, na parte inferior da câmara.

As câmaras foram incubadas por 120 min a 37°C, em atmosfera úmida, com 5% de CO₂. Após este período, os filtros foram removidos, fixados em etanol absoluto, corados com hematoxilina de Harris, desidratados pela passagem em concentração gradativamente crescentes de álcool etílico, diafanizados em xilol e finalmente montados entre lâmina e lamínula com auxílio de bálsamo do Canadá.

Foram realizadas, em duplicatas, para monócitos e polimorfonucleares, as seguintes combinações:

Fagócitos do paciente + soro de normal com LPS;
Fagócitos do paciente + soro de paciente com LPS;
Fagócitos do controle + soro de normal com LPS;
Fagócitos do controle + soro de paciente com LPS;
Fagócitos do paciente + solução de Hanks;
Fagócitos do controle + solução de Hanks.

4.7.3 - Leitura

Para a realização da leitura, utilizou-se a objetiva do microscópio 40 x (aumento de 40 vezes) e o ajuste fino de micrômetro.

Através da variação observada no micrômetro, mediu-se a distância entre a camada de células que ficou mais próxima do compartimento superior da câmara de BOYDEN, predominantemente linfocitária, até o campo onde pelo menos três células foram visualizadas. O resultado, expresso em micra, foi dado pela média de 20 leituras realizadas para cada membrana de filtro usada para os monócitos e polimorfonucleares.

4.8 - FAGOCITOSE DE ERITRÓCITOS DE CARNEIRO INCUBADOS COM ANTICORPOS DE COELHO ANTI-ERITRÓCITOS DE CARNEIRO (EA)

4.8.1 - Obtenção de partículas EA

Eritrócitos de carneiro (E) conservados por, no máximo, uma semana a 4°C, em solução de Alsever estéril, foram

lavados três vezes em solução de NaCl a 0,85% e em seguida, a concentração foi ajustada para 5%, em solução de Hanks. A suspensão celular foi então incubada por 30 min. a 37°C com igual volume de anticorpo anti-E numa diluição 1:320 determinada como título subaglutinante. Após este período de incubação, os eritrócitos foram lavados três vezes em solução de Hanks e ajustada a concentração para 0,5%.

4.9 - FAGOCITOSE DE PARTÍCULAS DE ZIMOSAN INCUBADAS PREVIAMENTE COM SORO HUMANO

As partículas de zimosan após serem fervidas e lavadas várias vezes em solução salina a 0,85%, foram suspensas em solução de Hanks contendo 10% do soro humano fresco ("pool" de adultos normais e soro de cada paciente, conservados a -90°C), numa concentração de 1×10^7 partículas/ml.

4.10 - ENSAIO FAGOCÍTICO (PARA EA E ZIMOSAN)

Um mililitro da suspensão contendo 1×10^6 leucócitos mononucleares de pacientes ou de controles normais(4.5), foi incubado no interior de tubos de LEIGHTON (contendo uma lamínula de vidro, previamente desengordurada e seca), por 30 min., a 37°C, em atmosfera úmida, com 5% de CO₂, para que os monócitos pudessem aderir à lamínula.

Após este período de incubação, os tubos foram lavados três vezes com agitação vigorosa, em solução de Hanks

ã temperatura ambiente , para a remoção das células que não aderiram, no caso, linfócitos.

Em seguida, as células aderentes à lamínula, foram incubadas por mais 30 min., nas mesmas condições anteriores, com uma suspensão de partículas previamente opsonizadas a serem fagocitadas, constituídas de EA, para investigação dos receptores para Fc da IgG (4.8.1) ou com zimosan incubado com soro (4.9) para evidênciação de receptores para a fração C3 do complemento.

Foram feitos também tubos-controle, onde a suspensão a ser fagocitada foi constituída de partículas não opsonizadas: suspensão de eritrócitos de carneiro (E) ou partículas de zimosan, incubadas por 30 min. a 37°C apenas com solução de Hanks.

Os experimentos foram realizados dentro do seguinte esquema:

-Fagocitose de Eritrócitos de Carneiro:

- Monócitos de paciente incubados com EA
- Monócitos de controle incubados com EA
- Monócitos de paciente incubados com E
- Monócitos de controle incubados com E

-Fagocitose de Zimosan:

- Monócitos de paciente + zimosan incubado com soro normal
- Monócitos de paciente + zimosan incubado com

com soro de paciente

-Monócitos de controle + zimosan incubado com soro normal

-Monócitos de controle + zimosan incubado com soro de paciente

-Monócito de paciente + zimosan incubado com Hanks

-Monócitos de controle + zimosan incubado com Hanks

Todos os experimentos foram realizados em duplicatas ou triplicatas, quando o número de células foi suficiente.

4.11 - COLORAÇÃO E LEITURA

Após 30 min. de incubação, como referido no item anterior 4.10, as lamínulas foram vigorosamente lavadas três vezes com solução de Hanks, à temperatura ambiente, para a remoção das partículas que não foram fagocitadas. Em seguida, as lamínulas foram retiradas do interior dos tubos de LEIGHTON e colocadas em um suporte para lamínulas. Para os experimentos com EA, procedeu-se à fixação com álcool metílico e coloração para hematoxilina-eosina.

Para as lamínulas previamente incubadas com zimosan, utilizou-se o corante de LEISHMAN.

Após a coloração, as lamínulas foram deixadas

secar, e a seguir, montadas entre lâmina e lamínula, com auxílio de bálsamo do Canadá.

Finalmente, a leitura em microscópio, foi realizada com a objetiva de imersão (aumento de 1000 vezes) contando-se 200 a 400 monócitos em cada lâmina, identificando-se as células que haviam fagocitado as partículas. Os resultados foram expressos em porcentagem de células que fagocitaram em relação ao número total de monócitos identificados definido como índice fagocitário e pelo número total de partículas fagocitadas por 100 monócitos, definido como capacidade fagocitária.

As técnicas descritas nos itens 4.7.1, 4.7.2, 4.7.3, 4.8.1, 4.9. 4.10 e 4.11 foram padronizadas para a execução deste trabalho, a partir de várias fontes da literatura (TERRITO & CLINE, 1976; MASUDA, 1977; VAN FURTH, VAN ZWET & LEIJH, 1978; LAZZARI, 1980). Durante esta padronização, os experimentos foram controlados pela avaliação da lise celular, identificada pela quantificação da desidrogenase láctica, enzima existente no citoplasma, até que se tivesse no máximo 10% de lise.

4.12 - ANORMALIDADES MORFOLÓGICAS DOS ERITRÓCITOS: MEDIDA DA FUNÇÃO ESPLÊNICA

Uma gota de sangue fresco, coletado sem anticoagulante, foi acrescentada a 0,3 ml de tampão fosfato em solução de cloreto de sódio (150 mmol/l), pH 7.4, contendo 2% de formaldeído. Após 30 min., a suspensão foi examinada como uma

preparação seca, sob microscopia de contraste de interferência direta (Microscópio Zeiss equipado com Nomarski optics). A porcentagem de eritrócitos tendo um ou mais "pits" foi determinado pela contagem de 500 células, independentemente do tamanho ou do número de "pits" por célula (PEARSON e col., 1979).

4.13 - MÉTODOS ESTATÍSTICOS

Para análise estatística dos dados, foram utilizados os seguintes testes:

1. Medidas de posição e variabilidade

1.1 - Quartis, percentis, amplitude semiquartil, valores máximos e mínimos.

2. Regressão linear

3. Gráficos de correlação (SNEDECOR & COCHRAN, 1967).

III - RESULTADOS

1. QUIMIOTAXIA DE POLIMORFONUCLEARES

Na figura 1, são apresentados os valores obtidos na mensuração da migração estimulada e espontânea de polimorfonucleares dos pacientes com doença falciforme, tendo sido utilizado como fator quimiotático, soro do paciente ou "pool" de soros normais incubados com endotoxina. Estes resultados indicam que a migração estimulada foi eficientemente mais elevada que a espontânea, demonstrando que nessas condições experimentais, a incubação do soro de pacientes ou "pool" de soros normais com LPS, foi capaz de gerar um estímulo quimiotático eficiente para estas células. Diante de um estímulo derivado da incubação de ambos os soros com LPS, os valores comparados da migração de polimorfonucleares não apresentaram diferenças nas suas distribuições (ver tabela I) mesmo tendo sido o fator quimiotático gerado de uma maneira diferente.

Na figura 2, comparam-se os valores de migração espontânea e estimulada dos polimorfonucleares do grupo controle, em resposta a um estímulo derivado da incubação de soro do paciente ou "pool" de soros normais com LPS. Verifica-se que, a semelhança do que ocorreu no grupo de pacientes a migração estimulada de polimorfonucleares demonstrou valores mais elevados do que a migração espontânea e o estímulo quimioatraente gerado por ambos os soros, apresentaram um desempenho semelhante.

Na figura 3 e tabela I, são comparados os valores de migração espontânea e estimulada, de polimorfonu-

cleares dos grupos de pacientes e controles, de acordo com a origem do soro utilizado na geração do estímulo quimioatraente . Para os polimorfonucleares de ambas as origens, houve geração de um estímulo quimioatraente eficaz, o que é demonstrado pelos valores mais elevados de migração estimulada. A migração estimulada destes fagócitos não demonstrou diferença na resposta quando se variou o tipo de soro, havendo inclusive uma correlação positiva dos valores obtidos para os polimorfonucleares de ambas as origens (figuras 4 e 5). Portanto, a comparação da migração espontânea e estimulada de polimorfonucleares de ambos os grupos são semelhantes.

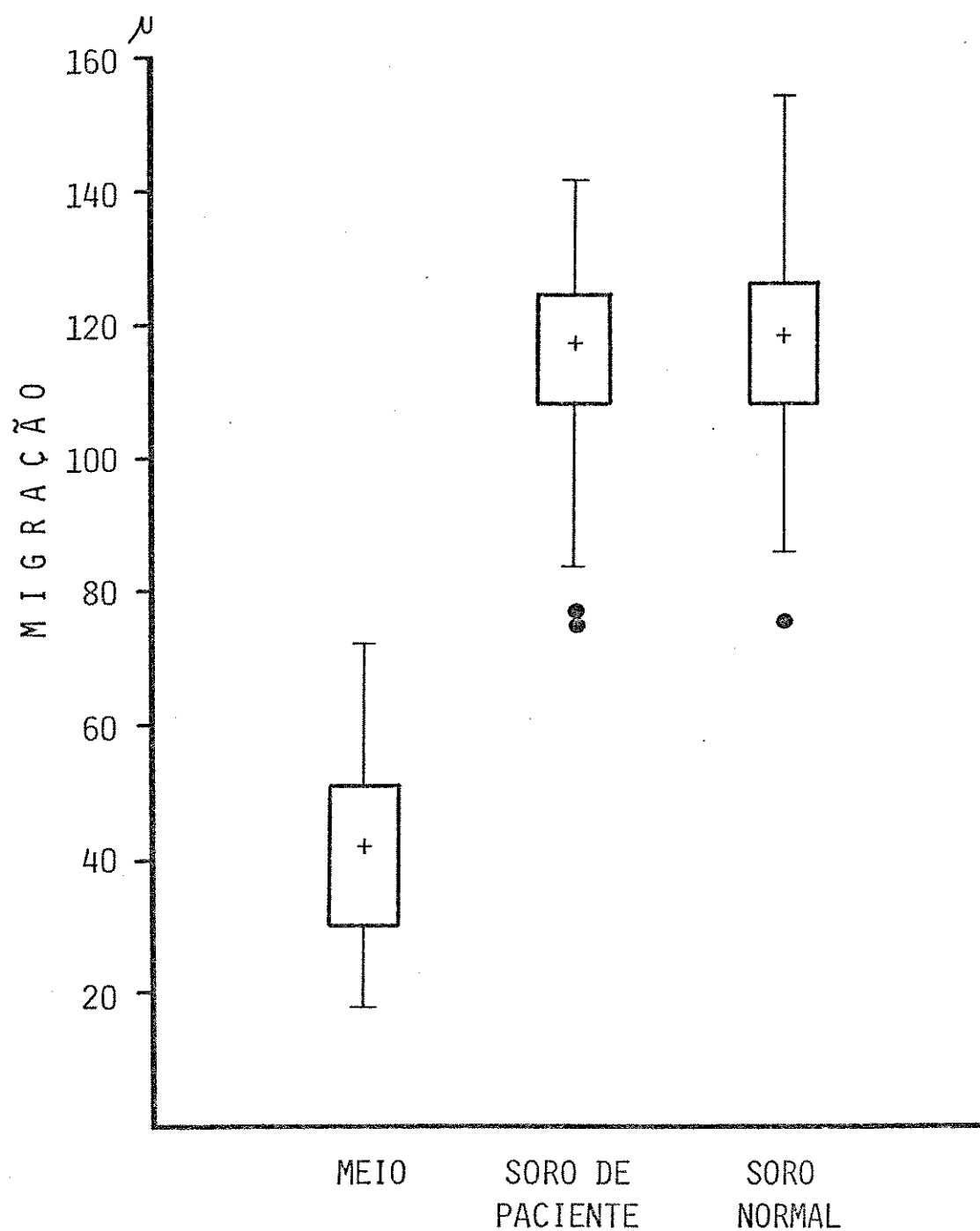


FIGURA 1 - QUIMIOTAXIA DE POLIMORFONUCLEARES DE PACIENTES COM DOENÇA FALCIFORME. PROVA REALIZADA NA AUSÊNCIA (MEIO) E PRESENÇA DE SORO DE PACIENTE OU DE SORO NORMAL, PREVIAMENTE INCUBADOS COM LPS.

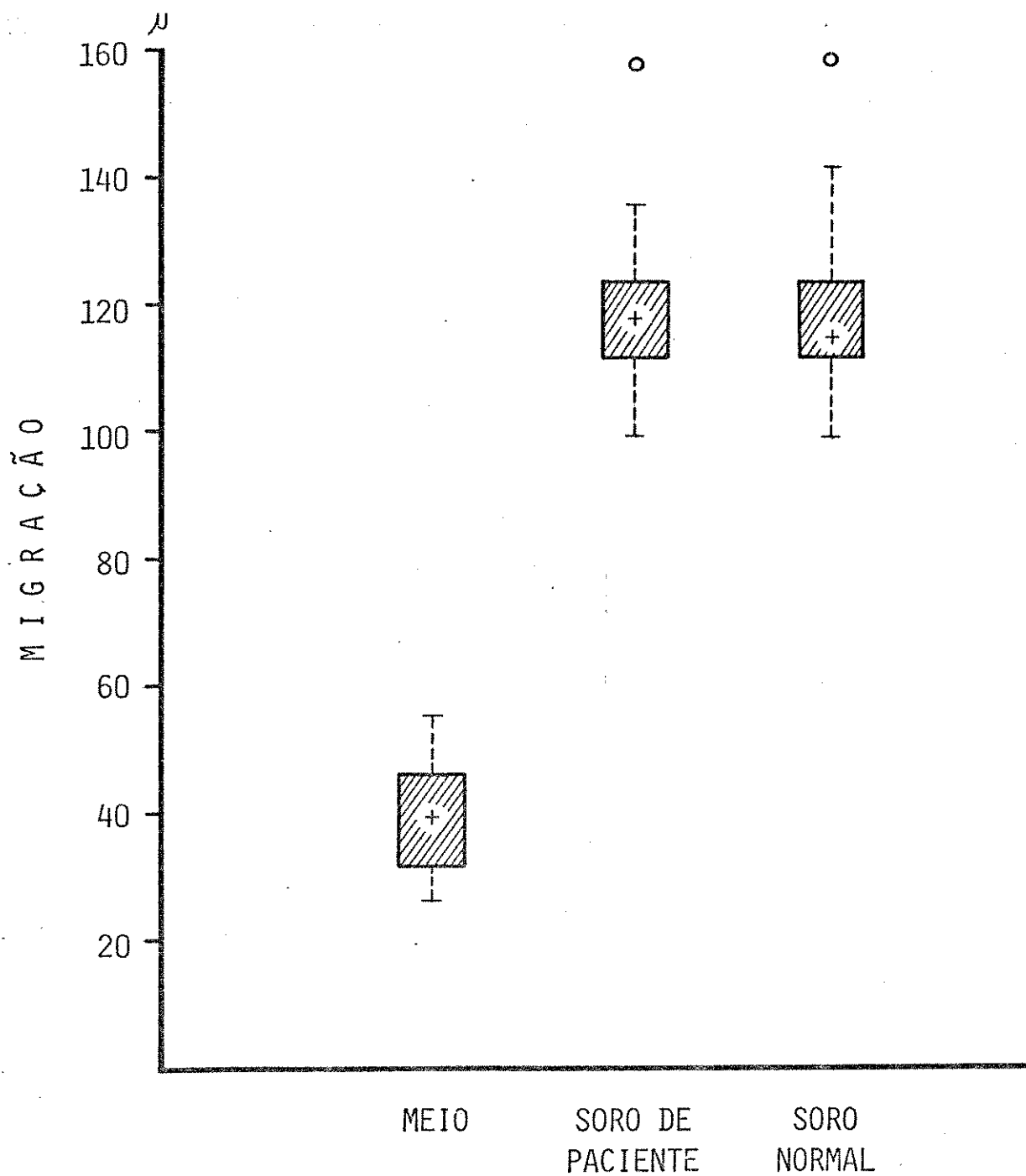
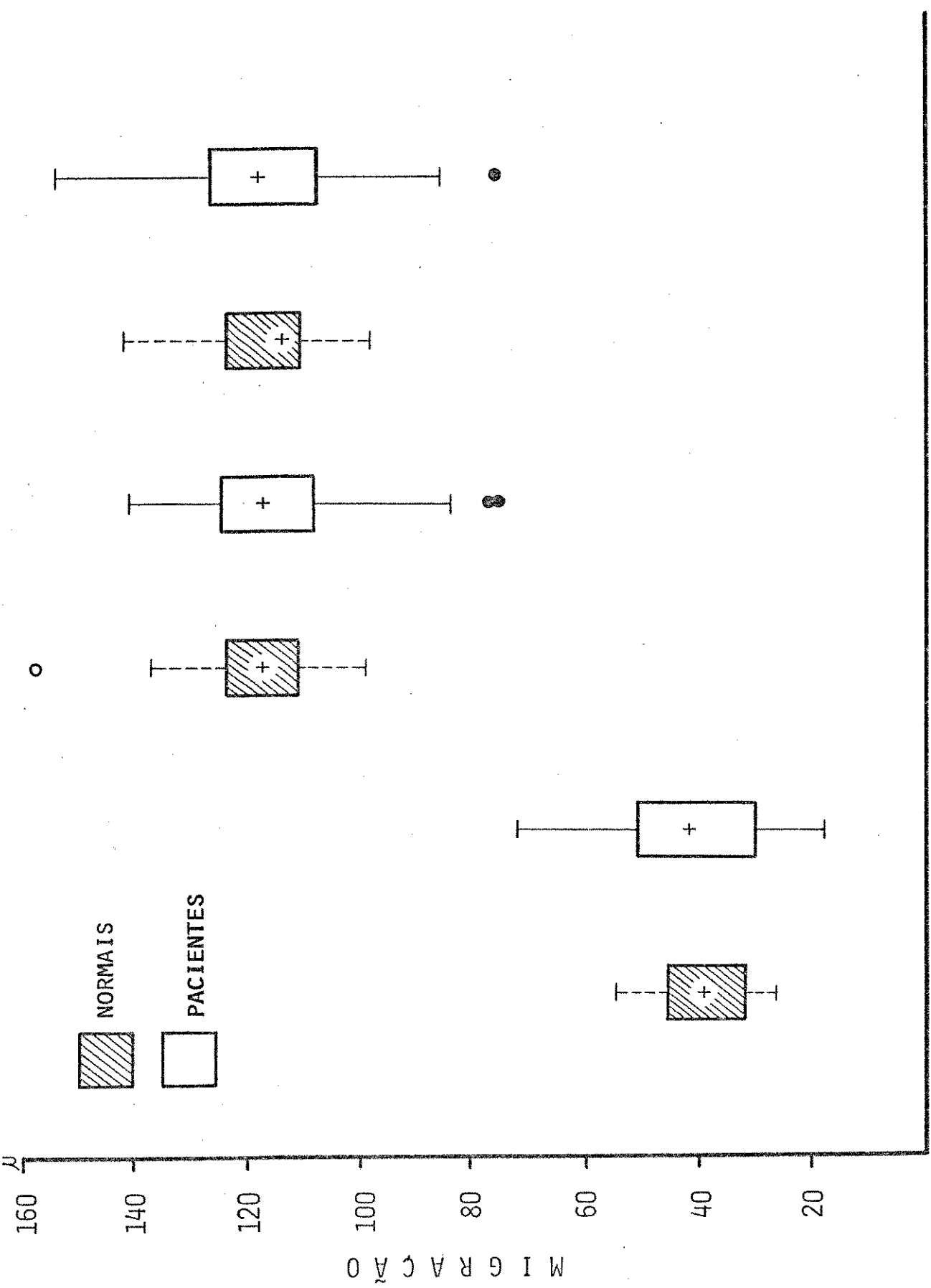


FIGURA 2 - QUIMIOTAXIA DE POLIMORFONUCLEARES DE INDIVÍDUOS NORMAIS. PROVA REALIZADA NA AUSÊNCIA (MEIO) E PRESENÇA DE SORO DE PACIENTE OU DE SORO NORMAL, PREVIAMENTE INCUBADOS COM LPS.



M E I O SORO DE PACIENTE SORO NORMAL

FIGURA 3 - QUIMIOTAXIA DE POLIMORFONUCLEARES DE INDIVÍDUOS NORMAIS E PACIENTES COM DOENÇA FALCIFORME. PROVA REALIZADA NA AUSÊNCIA (MEIO) E PRESENÇA DE SORO DE PACIENTE OU DE SORO NORMAL, PREVIAMENTE INCUBADOS COM LPS.

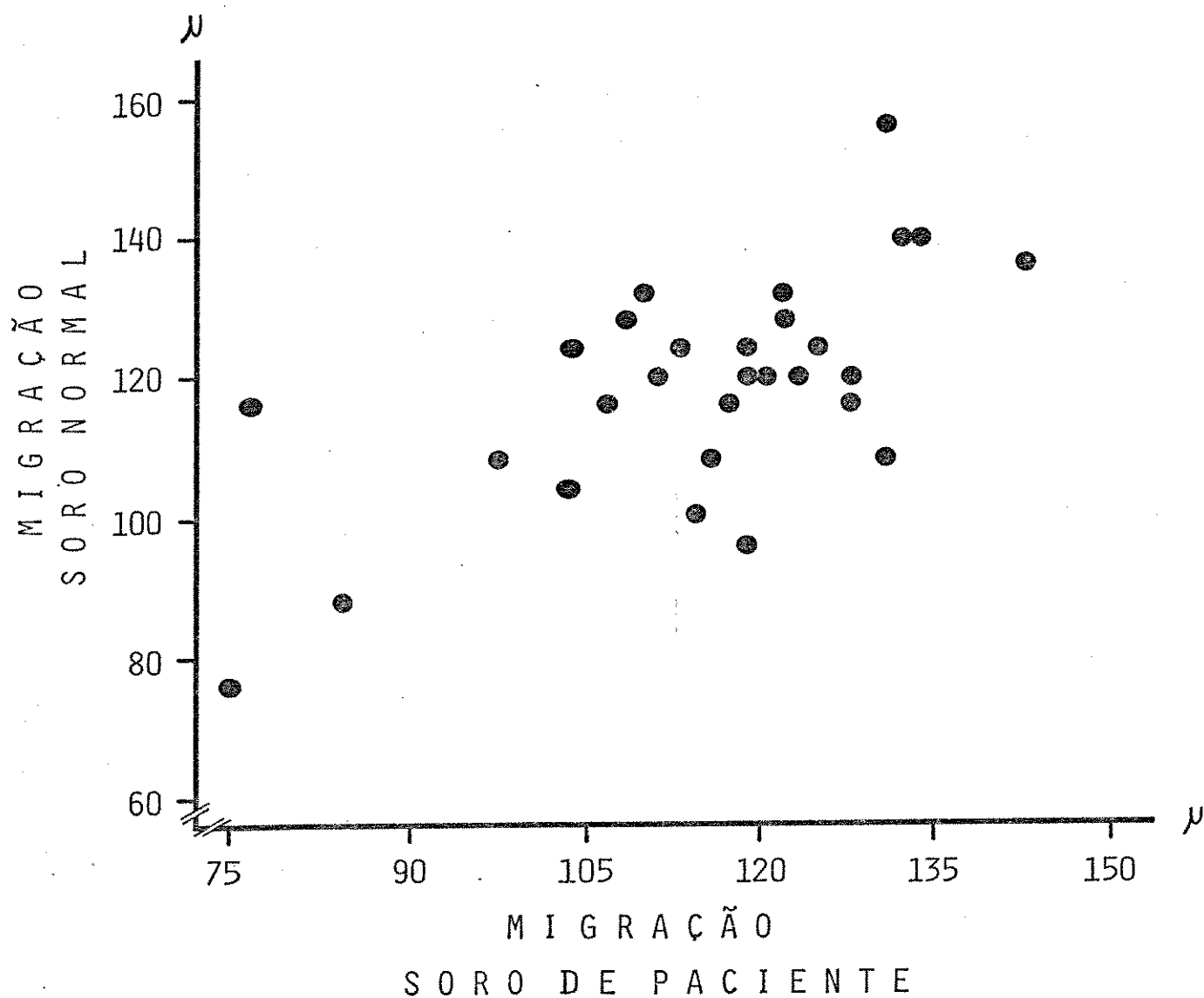


FIGURA 4 - CORRELAÇÃO ENTRE AS ATIVIDADES QUIMIOTÁTICAS DE SORO NORMAL E DE SORO DE PACIENTE. PROVAS REALIZADAS COM POLIMORFONUCLEARES DE PACIENTES COM DOENÇA FALCIFORME E SOROS ATIVADOS COM LPS.

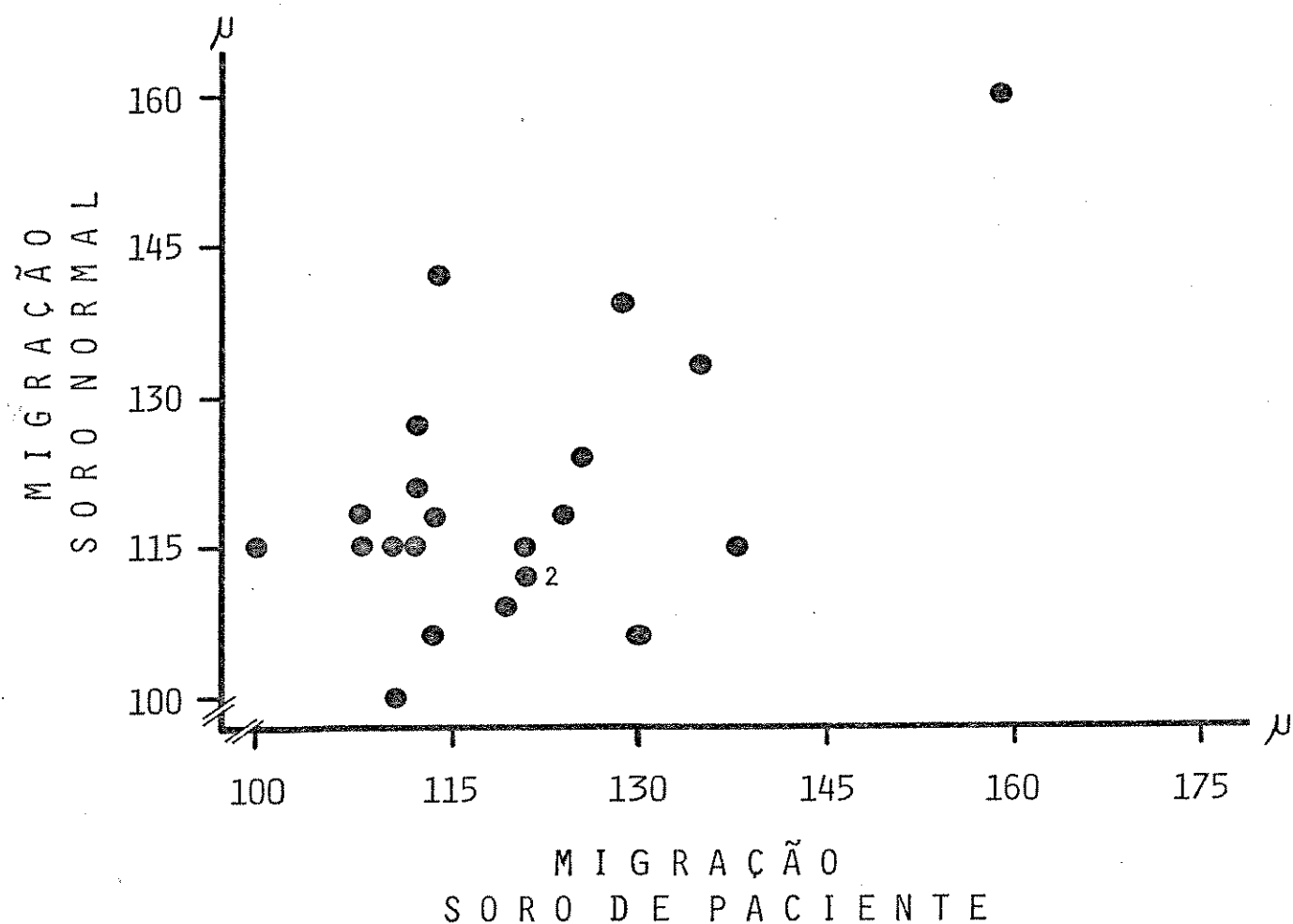


FIGURA 5 - CORRELAÇÃO ENTRE AS ATIVIDADES QUIMIOTÁTICAS DE SORO NORMAL E DE SORO DE PACIENTE. PROVAS REALIZADAS COM POLIMORFONUCLEARES DE INDIVÍDUOS NORMAIS E SOROS ATIVADOS COM LPS.

TABELA I - QUIMIOTAXIA DE POLIMORFONUCLEARES DE PACIENTES COM DOENÇA FALCIFORME E DE INDIVÍDUOS NORMAIS. PROVAS REALIZADAS NA AUSÊNCIA (MEIO) E PRESENÇA DE SORO DE PACIENTE OU DE SORO NORMAL, PREVIAMENTE INCUBADOS COM LPS.

POLIMORFONUCLEARES P A C I E N T E S						POLIMORFONUCLEARES I N D I V Í D U O S N O R M A I S					
MÉDIA	*DP	MEDIANA	VALOR MÍNIMO	VALOR MÁXIMO		MÉDIA	DP	MEDIANA	VALOR MÍNIMO	VALOR MÁXIMO	
SORO NORMAL ** N=30	118	16	118	76	154	SORO NORMAL N=25	120	13	114	99	157,5
SORO DE PACIENTE N=29	114,7	16	117	75	141	SORO DE PACIENTE N=24	120	12	117	99	157,5
MEIO N=27	44	16	42	18	75	MEIO N=24	39,6	9,0	39	26	54,6

* DP : DESVIO PADRÃO

** N : NÚMERO DE INDIVÍDUOS ESTUDADOS
VALORES DE MIGRAÇÃO EM μ

2. QUIMIOTAXIA DE MONÓCITOS

Na figura 6, o desempenho de monócitos de pacientes, quanto à migração estimulada e espontânea, é apresentado, tendo sido usado, soro do paciente ou "pool" de soros normais incubado com LPS, como fator quimiotático. Na figura 7, comparam-se os valores de migração estimulada e espontânea de monócitos do grupo controle, utilizando-se como estímulo quimiotático ambos os soros incubados com a mesma endotoxina bacteriana. Para os monócitos de ambas as origens, houve geração de um estímulo quimioatraente eficaz, o que é demonstrado pelos valores mais elevados de migração estimulada. E, à semelhança do que ocorreu no grupo de pacientes, no grupo controle também não foram observadas diferenças nas distribuições quando se utilizou fontes quimiotáticas diferentes, observando-se também uma correlação positiva da capacidade migratória destes fagócitos em ambos os grupos (Figuras 9 e 10).

Na figura 8 e tabela II, comparam-se a capacidade migratória de monócitos de pacientes e controles, não tendo sido observadas diferenças nas distribuições da migração espontânea e estimulada, nos dois grupos. Estes resultados indicam que, do mesmo modo como os polimorfonucleares, os monócitos de pacientes, com doença falciforme, apresentaram um desempenho semelhante ao do grupo controle. Além disso o soro de paciente incubado com LPS não inibiu esta atividade, apresentando a mesma eficácia do "pool" de soros normais.

Não foi encontrada nenhuma correlação linear entre a quimiotaxia de polimorfonucleares e de monócitos e idade nos dois grupos de indivíduos estudados. Portanto, o pareamento por idade, para estudo desta função, foi efetivo, uma vez que a análise de regressão das variáveis estudadas contra a idade, não revela que este fator influencie as respostas.

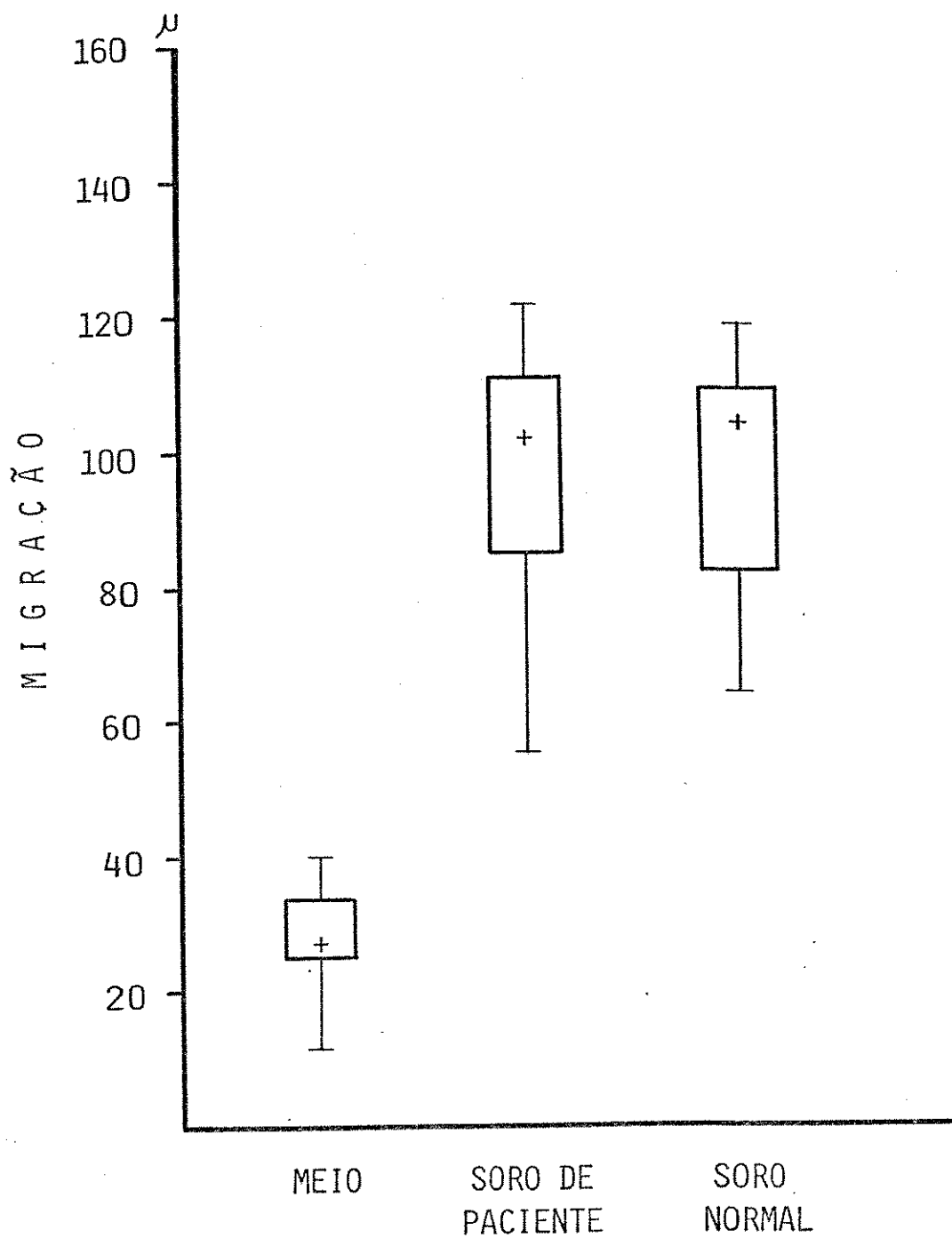


FIGURA 6 - QUIMIOTAXIA DE MONÓCITOS DE PACIENTES COM DOENÇA FALCIFORME. PROVAS REALIZADAS NA AUSÊNCIA (MEIO) E PRESENÇA DE SORO DE PACIENTE OU DE SORO NORMAL, PREVIAMENTE INCUBADOS COM LPS.

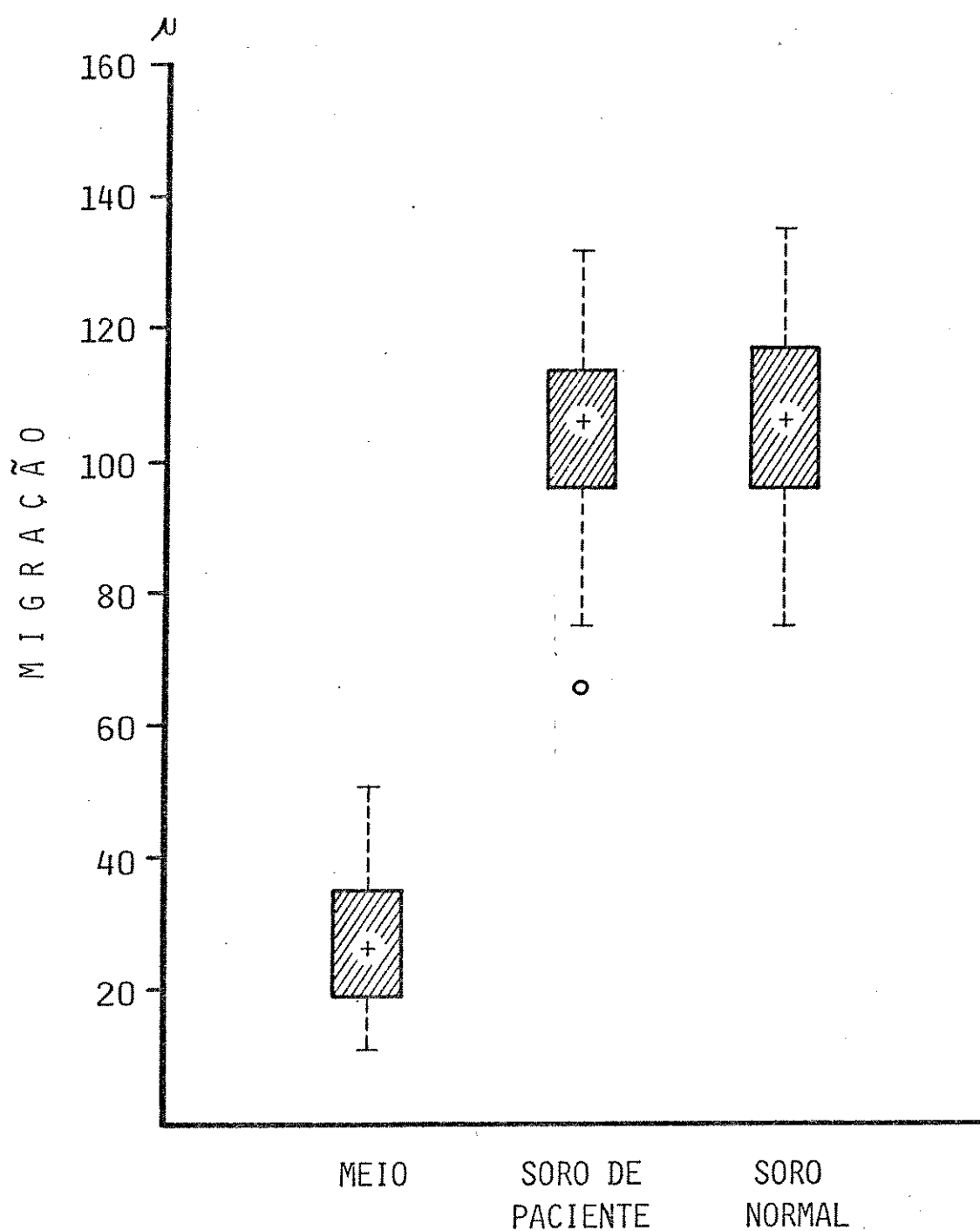


FIGURA 7 - QUIMIOTAXIA DE MONÓCITOS DE INDIVÍDUOS NORMAIS. PROVA REALIZADA NA AUSÊNCIA (MEIO) E PRESENÇA DE SORO DE PACIENTE COM DOENÇA FALCIFORME OU SORO NORMAL, PREVIAMENTE INCUBADOS COM LPS.

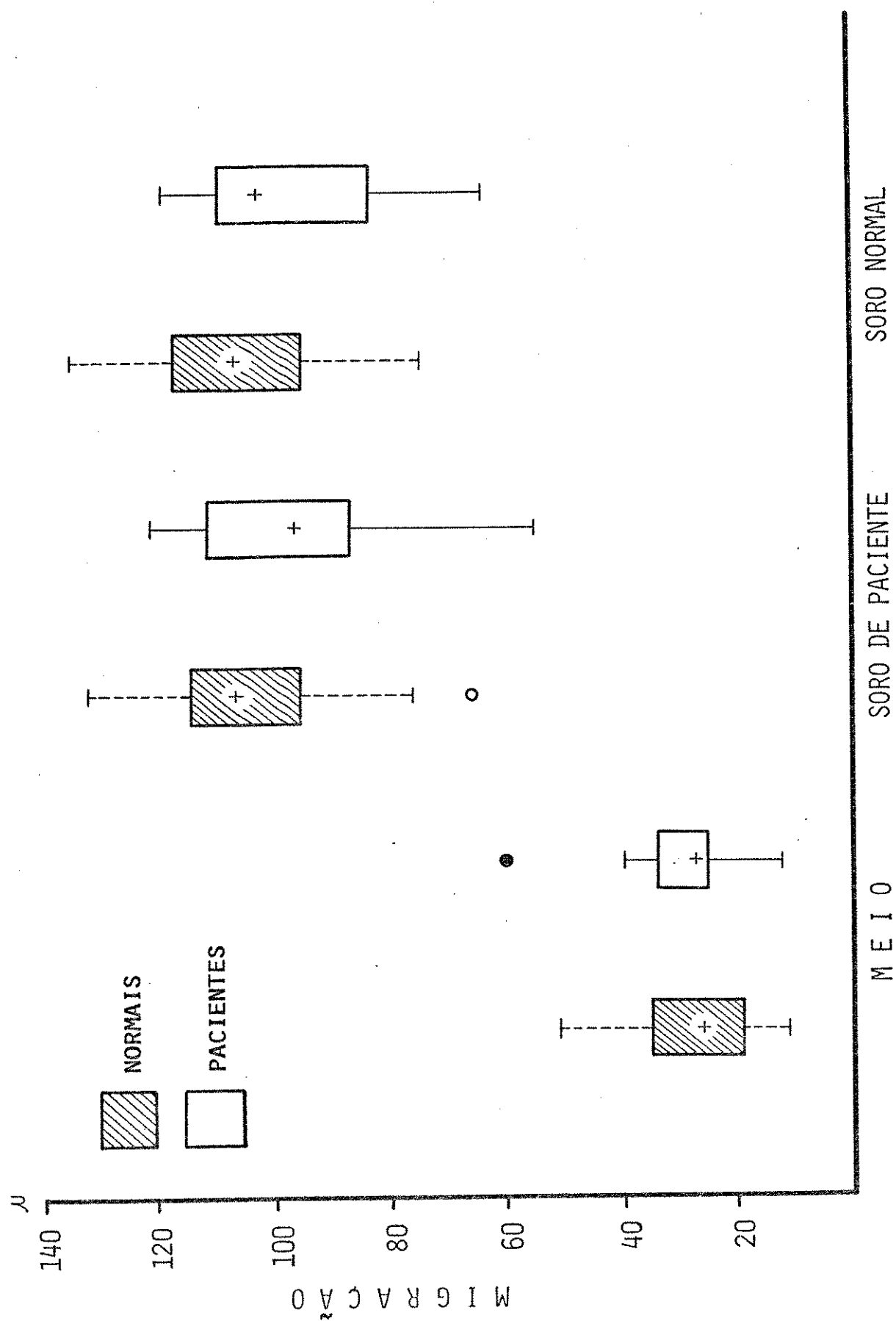


FIGURA 8 - QUIMIOTAXIA DE MONÓCITOS DE INDIVÍDUOS NORMAIS E PACIENTES COM DOENÇA FALCIFORME DETERMINADA NA AUSÊNCIA (MEIO) E PRESENÇA DE SORO DE PACIENTE OU DE SORO NORMAL, PREVIAMENTE INCUBADOS COM LPS.

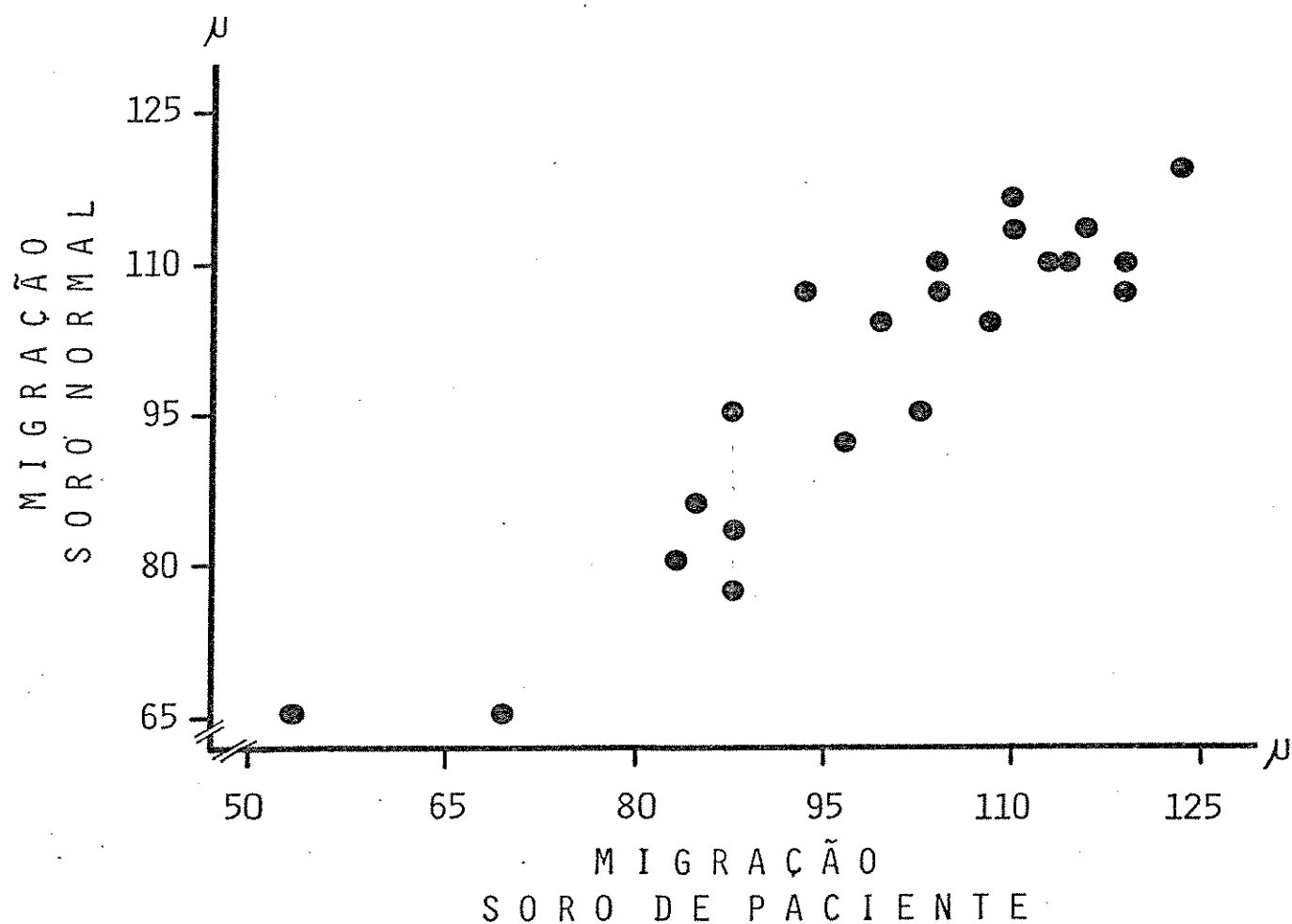


FIGURA 9 - CORRELAÇÃO ENTRE AS ATIVIDADES QUIMIOTÁTICAS DE SORO NORMAL E DE SORO DE PACIENTE. PROVAS REALIZADAS COM MONÓCITOS DE PACIENTES COM DOENÇA FALCIFORME E SOROS ATIVADOS COM LPS.

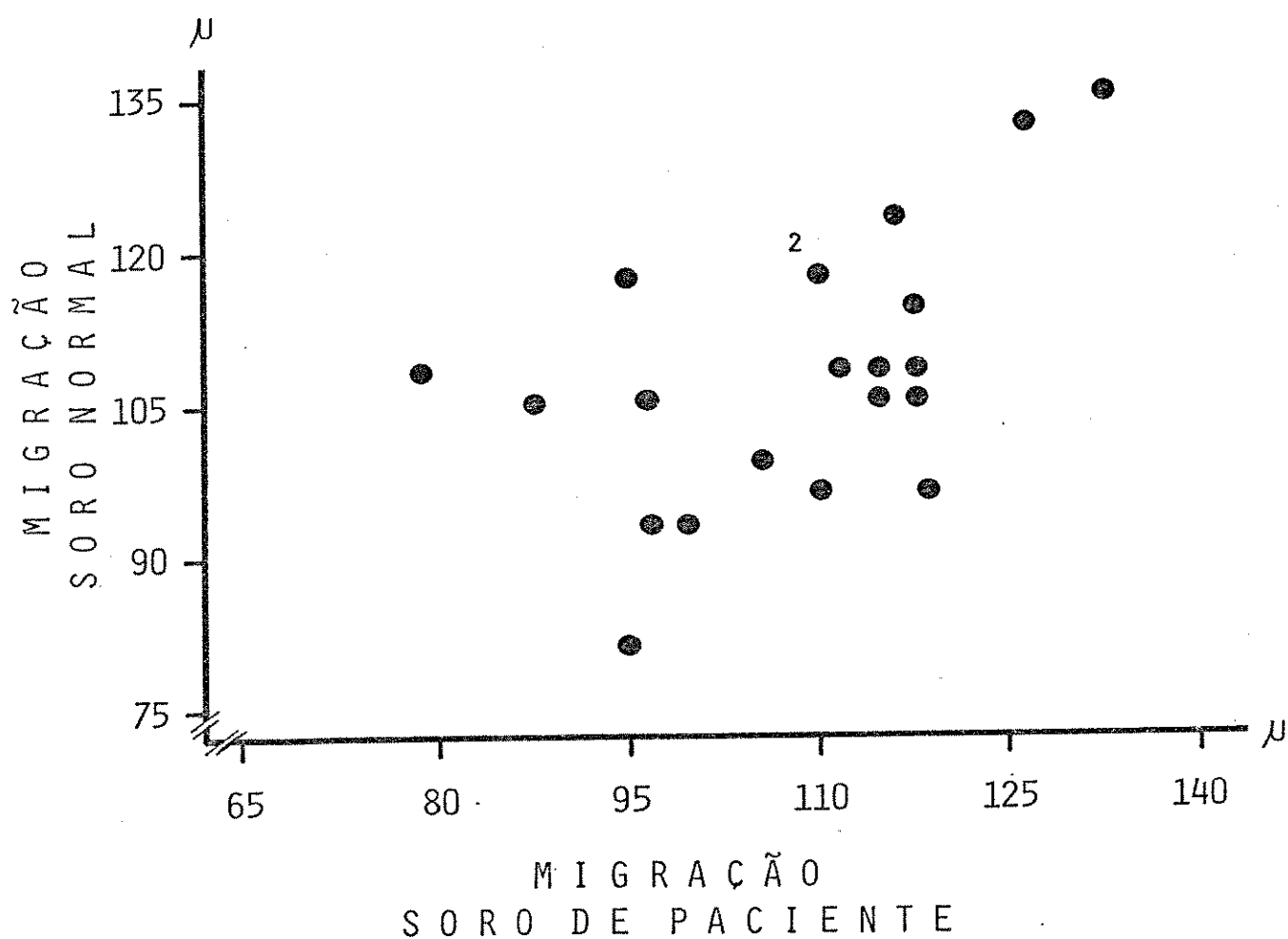


FIGURA 10 - CORRELAÇÃO ENTRE AS ATIVIDADES QUIMIOTÁTICAS DE SORO NORMAL E DE SORO DE PACIENTE, PROVAS REALIZADAS COM MONÓCITOS DE INDIVÍDUOS NORMAIS E SOROS ATIVADOS COM LPS.

3. FAGOCITOSE

3.1 - FAGOCITOSE DE PARTÍCULAS DE ZIMOSAN

Nas figuras 11 e 12 , estão representados os resultados da capacidade e índice fagocitários de monócitos de pacientes para partículas de zimosan, incubados com soro de origem do paciente e com "pool" de soros normais, não se observando diferenças nas atividades fagocitárias destas células para o zimosan incubado com soros de origens distintas.

Uma semelhança de valores do índice fagocitário destes monócitos para zimosan incubado com soro de pacientes e com "pool" de soros normais é observado (figura 14), enquanto na capacidade fagocitária, (figura 13), aos pares não ocorrem valores correspondentes e sim misturas deles, sugerindo que os valores encontrados para zimosan, incubado com soro de paciente não prediz os valores para zimosan incubado, com "pool" de soros normais.

Nas figuras 15 e 16 , comparam-se os resultados da capacidade e índice fagocitários de monócitos do grupo controle, respectivamente, para partículas de zimosan, utilizando-se também para a incubação os mesmos soros. Verifica-se que os monócitos deste grupo apresentam um desempenho semelhante para as funções estudadas, mesmo quando a incubação é realizada com soro de origem de paciente, ocorrendo, inclusive, uma correlação positiva dos valores obtidos na fagocitose de zimosan incubado com soro de paciente e com "pool" de soros

normais (figuras 17 e 18).

Nas figuras 19 e 20, são comparados a fagocitose de monócitos de pacientes e de controles para o zimosan incubado com ambos os soros. Observa-se que tanto os valores da capacidade fagocitária quanto do índice fagocitário de monócitos de pacientes são reduzidos, em relação às mesmas células do grupo controle. Isto é evidenciado pelas diferenças nas distribuições representadas nestas figuras (ver tabelas III e IV). Enquanto uma variabilidade maior dos valores máximos e mínimos da capacidade fagocitária é observada no grupo controle, no grupo de pacientes, uma maior dispersão é demonstrada nos valores do índice fagocitário.

Nas figuras 21 e 22, são comparados os resultados de fagocitose obtidos no grupo controle, no grupo de pacientes com doença SS e no grupo total de pacientes. Verifica-se que o grupo SS apresenta valores máximos e mínimos de variabilidade, assim como de medianas e quartis semelhantes aos observados no grupo total de pacientes. Esta análise indica que, os doentes de genótipo SS devem contribuir para maior dispersão nos resultados obtidos do índice fagocitário.

Os controles de fagocitose de zimosan não incubado (ZNI), mostraram valores que variaram entre zero e 55% para o grupo de pacientes e entre 10% e 50% para o grupo controle (Ver tabelas III e IV).

A análise de regressão das variáveis zimosan incubado com "pool" de soros normais (Zsnl) e com soro de pa-

cientes (Zsp), assim como zimosan não incubado (Zni) contra a idade, em ambos os grupos, não demonstra uma correlação linear.

Na figura 23 é exibido um aspecto da fagocitose de partículas de zimosan por monócitos de pacientes.

3.2 - FAGOCITOSE DE PARTÍCULAS EA

Na fagocitose de eritrócitos de carneiro (E) opsonizados com soro de coelho anti-eritrócito de carneiro (EA), os monócitos periféricos de pacientes mostraram uma capacidade e índice fagocitários significativamente reduzidos em relação aos monócitos do grupo controle (figuras 11, 12, 15, 16, 19, 20, 21 e 22).

Não se detectou fagocitose quando se fez o controle com eritrócitos de carneiro não opsonizados (E), tanto para células de pacientes como do grupo controle.

O pareamento por idade para estudo desta função foi efetivo, tendo em vista que a análise de regressão desta variável contra a idade, não revela que este aspecto influencie a resposta.

Na figura 24 é apresentado um aspecto da fagocitose de partículas EA por monócitos de paciente com doença falciforme.

TABELA II - QUIMIOTAXIA DE MONÓCITOS DE PACIENTES COM DOENÇA FALCIFORME E DE INDIVÍDUOS NORMAIS. PROVAS REALIZADAS NA AUSÊNCIA (MEIO) E PRESENÇA DE SORO DE PACIENTE OU DE SORO NORMAL, PREVIAMENTE INCUBADOS COM LPS.

MONÓCITOS PACIENTES					MONÓCITOS INDIVÍDUOS NORMAIS						
MÉDIA	*DP	MEDIANA	VALOR MÍNIMO	VALOR MÁXIMO		MÉDIA	DP	MEDIANA	VALOR MÍNIMO	VALOR MÁXIMO	
SORO NORMAL **N=22	98,7	16	103,5	64,5	120	SORO NORMAL N=25	107	16	106,5	75	135
SORO DE PACIENTE N=23	99	17	102	55	121,5	SORO DE PACIENTE N=29	105	16	106,5	66	132
MEIO N=23	29,7	9,7	27	12	60	MEIO N=28	27,6	10	26	11	51

* DP : DESVIO PADRÃO

** N : NÚMERO DE INDIVÍDUOS ESTUDADOS
VALORES DE MIGRAÇÃO EM μ

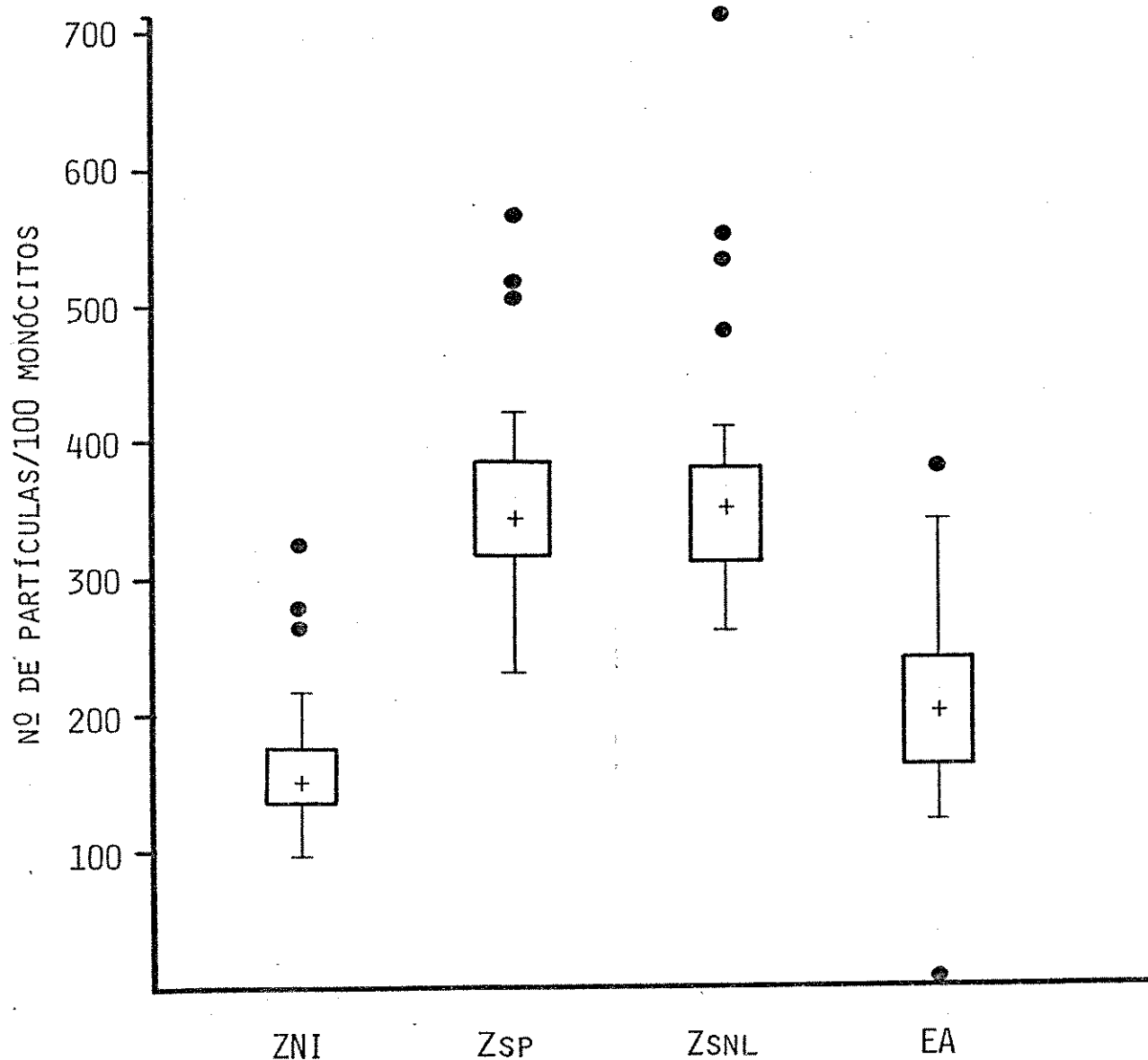


FIGURA 11 - CAPACIDADE FAGOCITÁRIA DE MONÓCITOS DE PACIENTES COM DOENÇA FALCIFORME. PROVAS REALIZADAS COM ERITRÓCITOS DE CARNEIRO SENSIBILIZADOS (EA) E PARTÍCULAS DE ZIMOSAN INCUBADAS OU NÃO (ZNI) COM SORO DE PACIENTE (ZSP) OU SORO NORMAL (ZSNL).

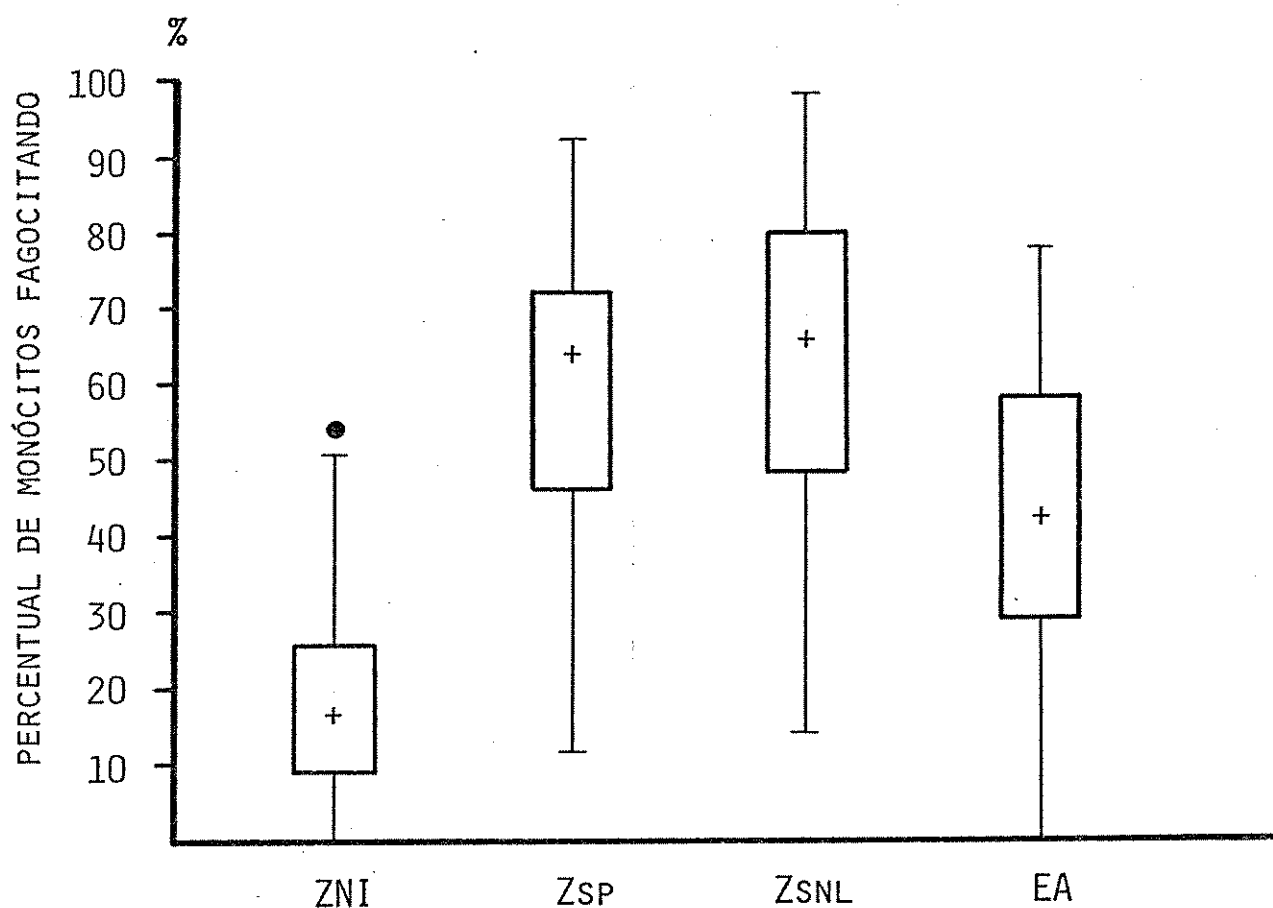


FIGURA 12 - ÍNDEX FAGOCITÁRIO DE MONÓCITOS DE PACIENTES COM DOENÇA FALCIFORME, PROVAS REALIZADAS COM ERITRÓCITOS DE CARNEIRO SENSIBILIZADOS (EA) E PARTÍCULAS DE ZIMOSAN INCUBADAS OU NÃO (ZNI) COM SORO DE PACIENTE (ZSP) OU SORO NORMAL (ZSNL).

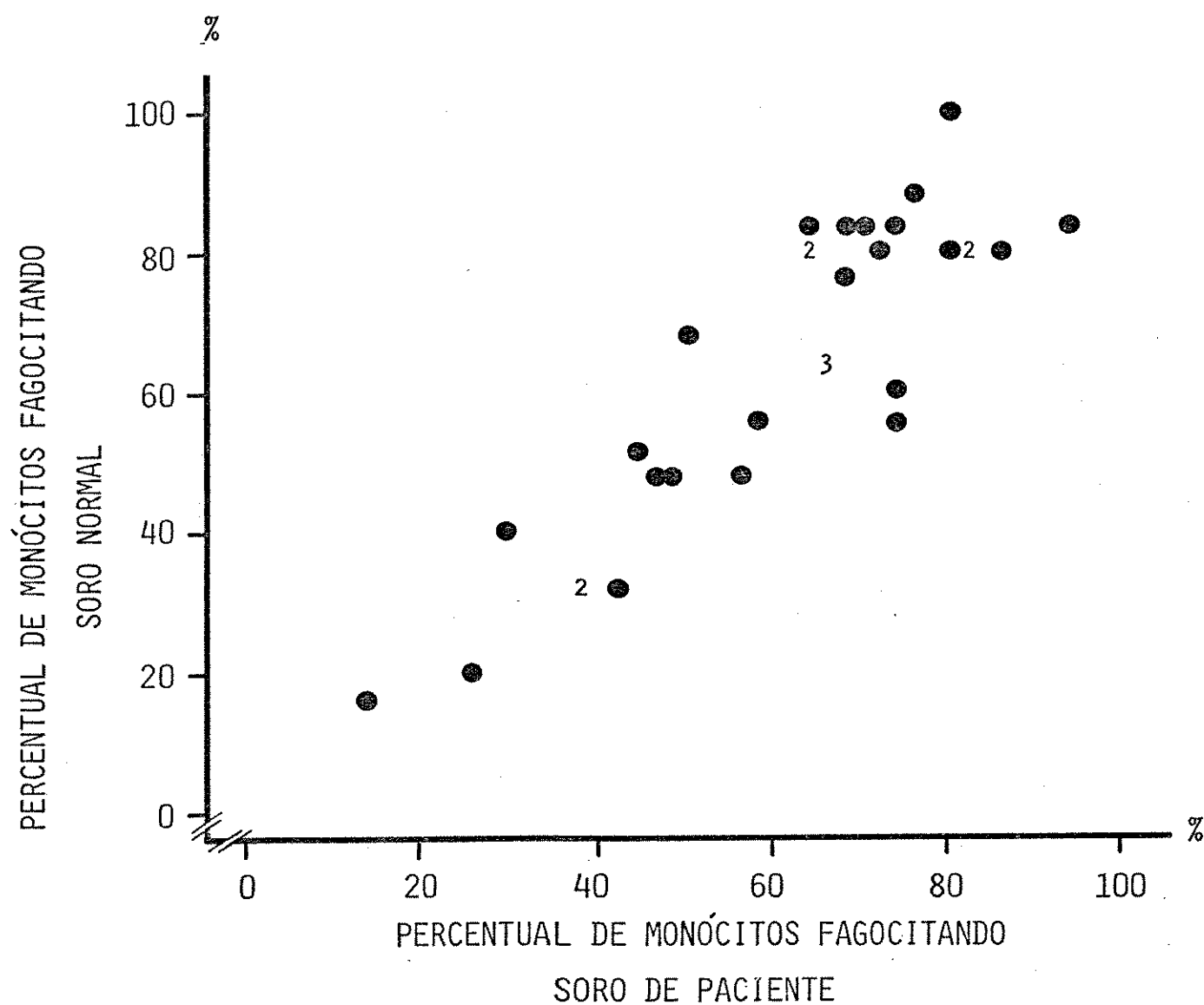


FIGURA 14 - ÍNDEX FAGOCITÁRIO DE MONÓCITOS DE PACIENTES COM DOENÇA FALCIFORME. CORRELAÇÃO ENTRE AS DETERMINAÇÕES REALIZADAS COM PARTÍCULAS DE ZIMOSAN INCUBADAS COM SORO NORMAL E COM SORO DE PACIENTE.

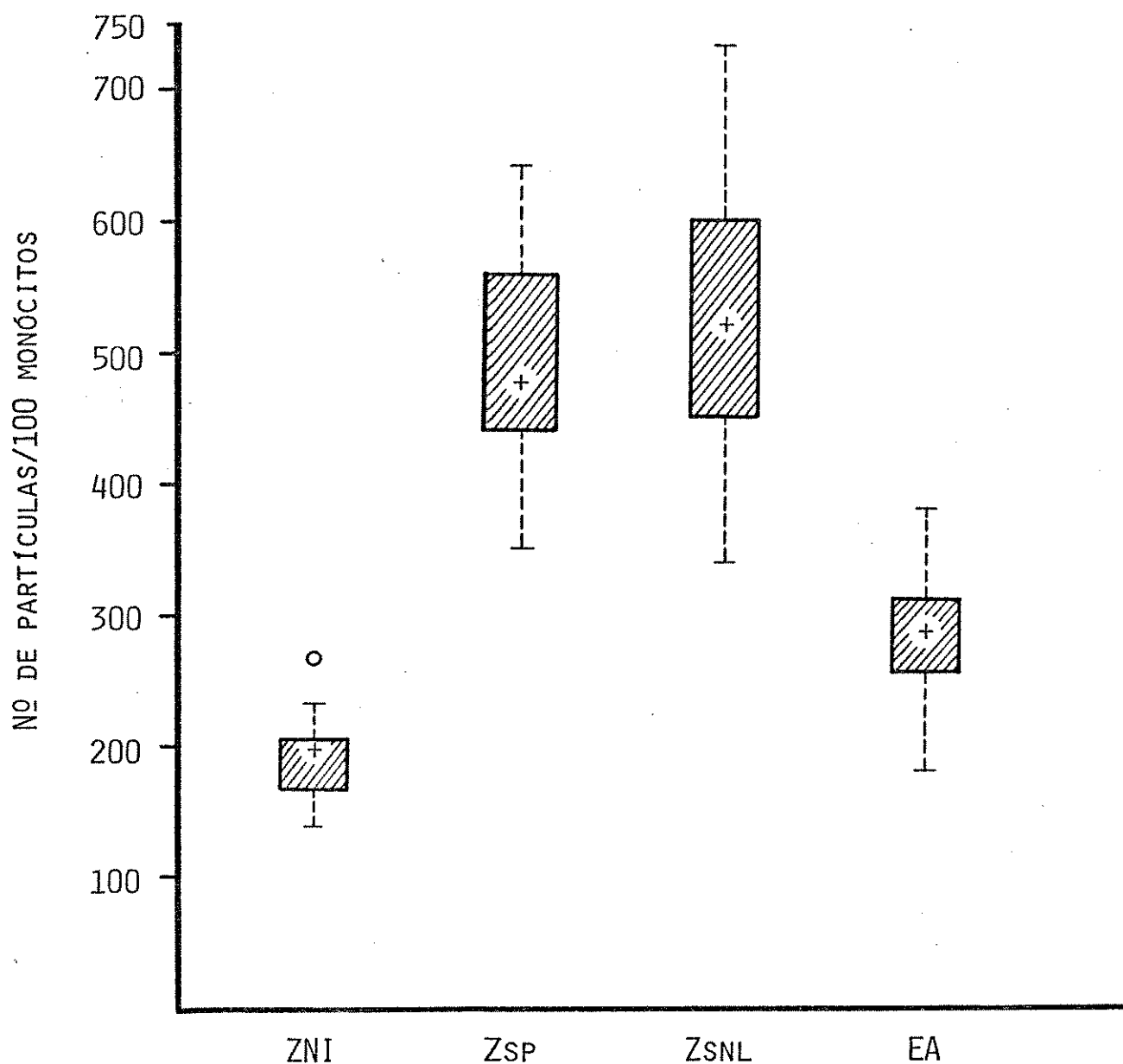


FIGURA 15 - CAPACIDADE FAGOCITÁRIA DE MONÓCITOS DE INDIVÍDUOS NORMAIS. PROVA REALIZADA COM ERITRÓCITOS DE CARNEIRO SENSIBILIZADOS (EA) E PARTÍCULAS DE ZIMOSAN INCUBADAS OU NÃO (ZNI) COM SORO DE PACIENTE (ZSP) OU SORO NORMAL (ZSNL).

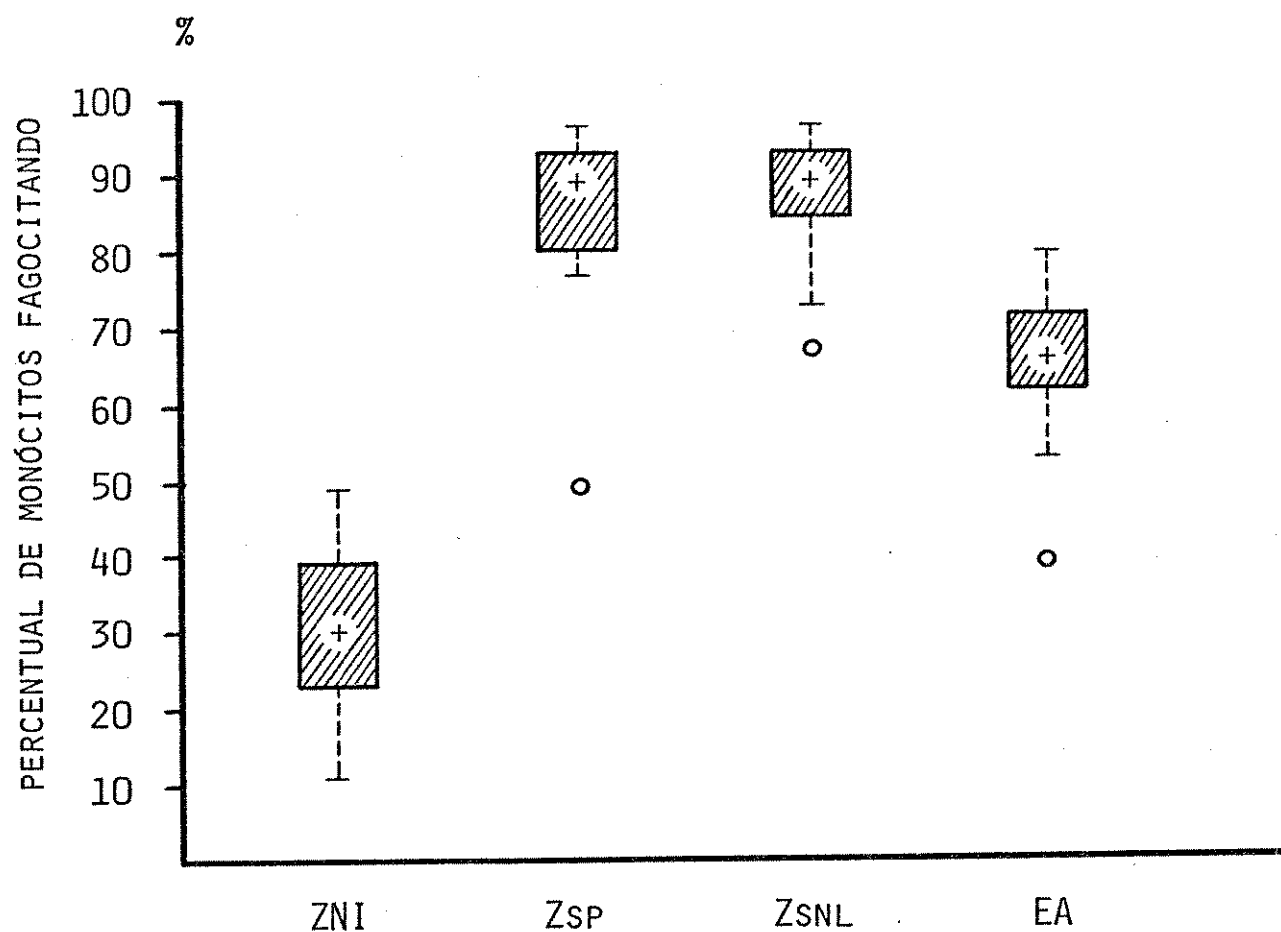


FIGURA 16 - ÍNDEX FAGOCITÁRIO DE MONÓCITOS DE INDIVÍDUOS NORMAIS. PROVAS REALIZADAS COM ERITRÓCITOS DE CARNEIRO SENSIBILIZADOS (EA) E PARTÍCULAS DE ZIMOSAN INCUBADAS OU NÃO (ZNI) COM SORO DE PACIENTE (ZSP) OU SORO NORMAL (ZSNL).

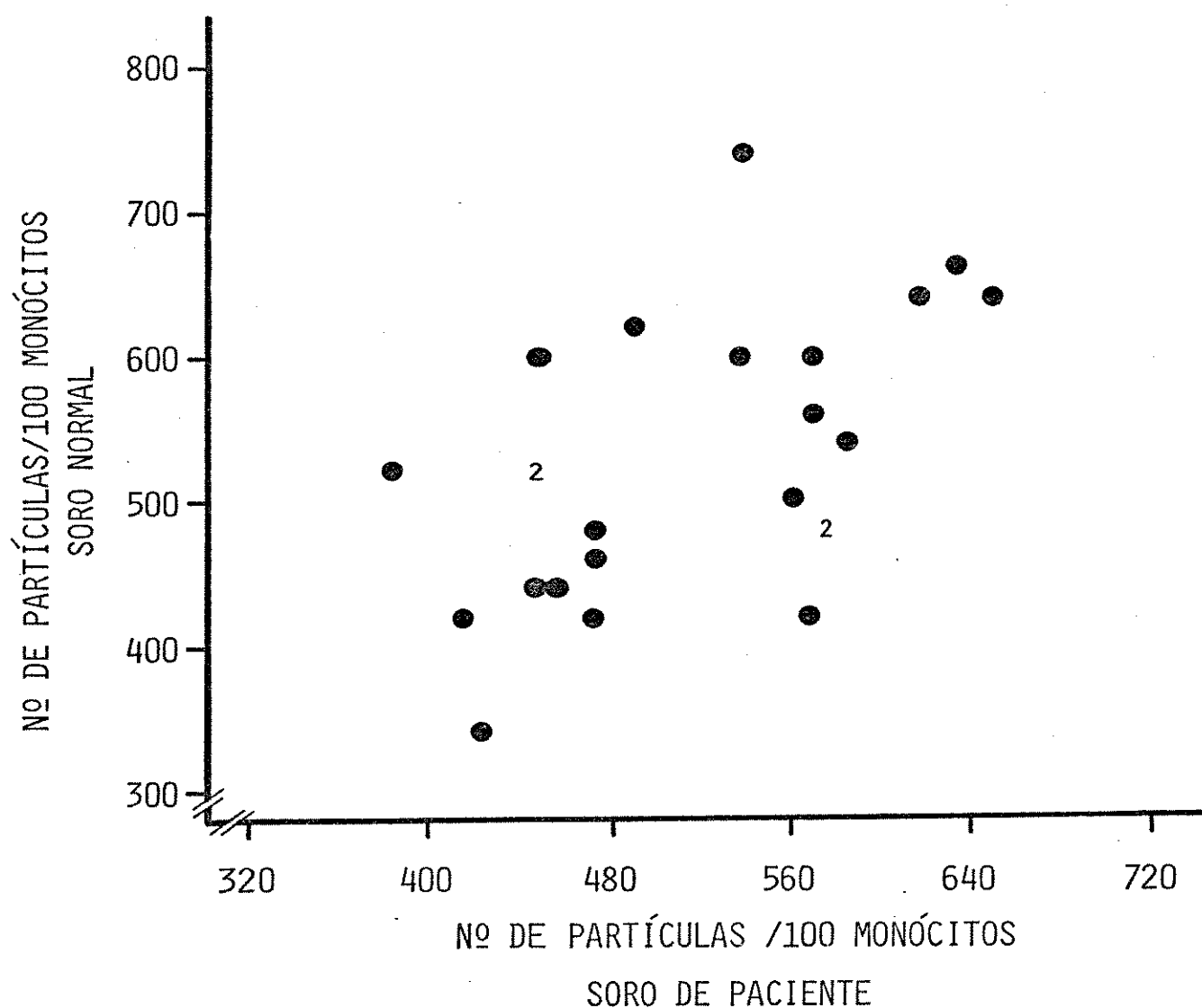


FIGURA 17 - CAPACIDADE FAGOCITÁRIA DE MONÓCITOS DE INDIVÍDUOS NORMAIS. CORRELAÇÃO ENTRE AS DETERMINAÇÕES REALIZADAS COM PARTÍCULAS DE ZIMOSAN INCUBADAS COM SORO NORMAL E COM SORO DE PACIENTE.

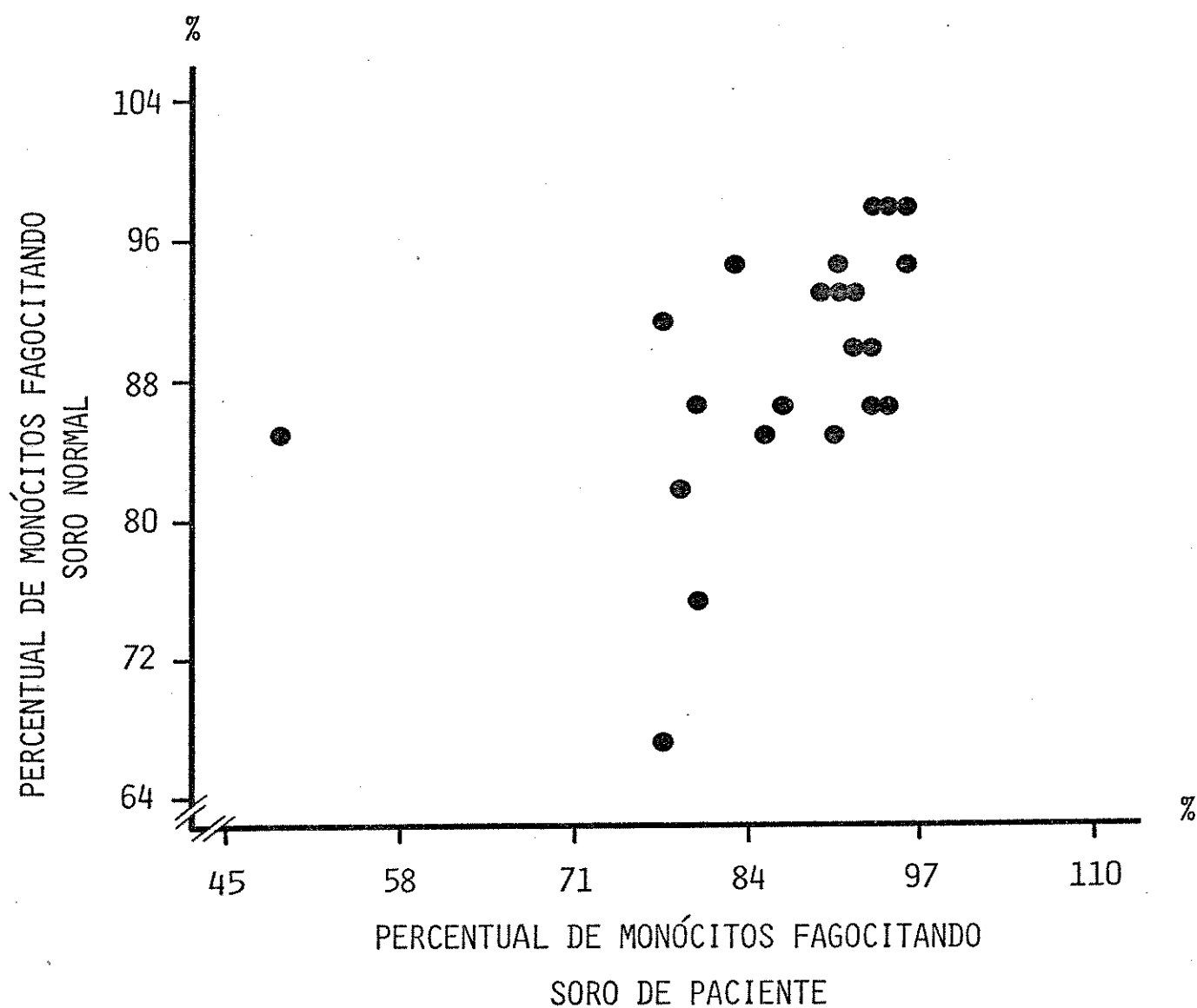


FIGURA 18 - ÍNDEX FAGOCITÁRIO DE MONÓCITOS DE INDIVÍDUOS NORMAIS. CORRELAÇÃO ENTRE AS DETERMINAÇÕES REALIZADAS COM PARTÍCULAS DE ZIMOSAN INCUBADAS COM SORO NORMAL E COM SORO DE PACIENTE.

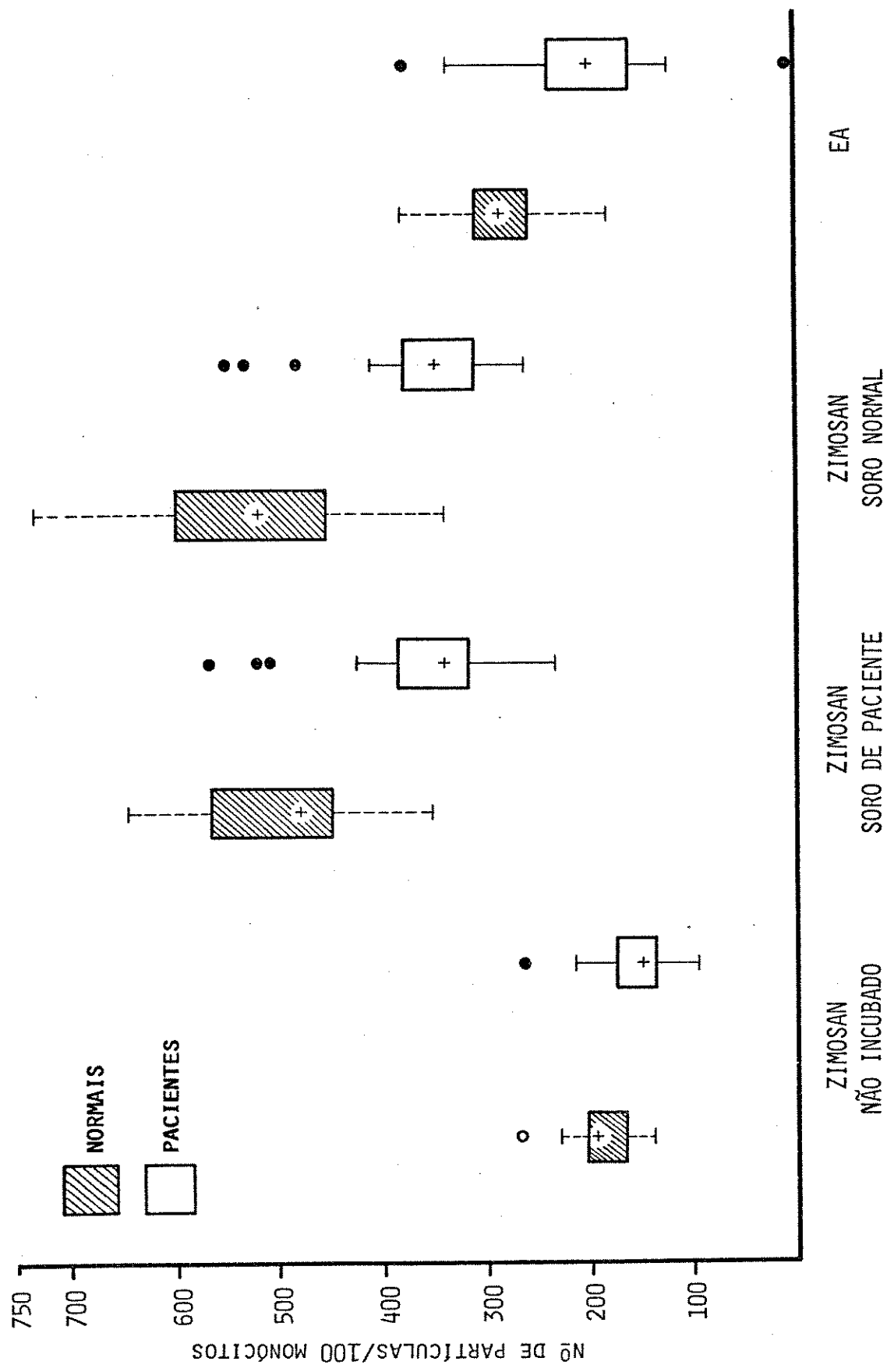


FIGURA 19 - CAPACIDADE FAGOCITÁRIA DE MONÓCITOS DE INDIVÍDUOS NORMAIS E PACIENTES COM DOENÇA FALCIFORME. PROVAS REALIZADAS COM ERITRÓCITOS DE CARNEIRO SENSIBILIZADOS (EA) E PARTÍCULAS DE ZIMOSAN INCUBADAS OU NÃO COM SORO DE PACIENTE E COM SORO NORMAL.

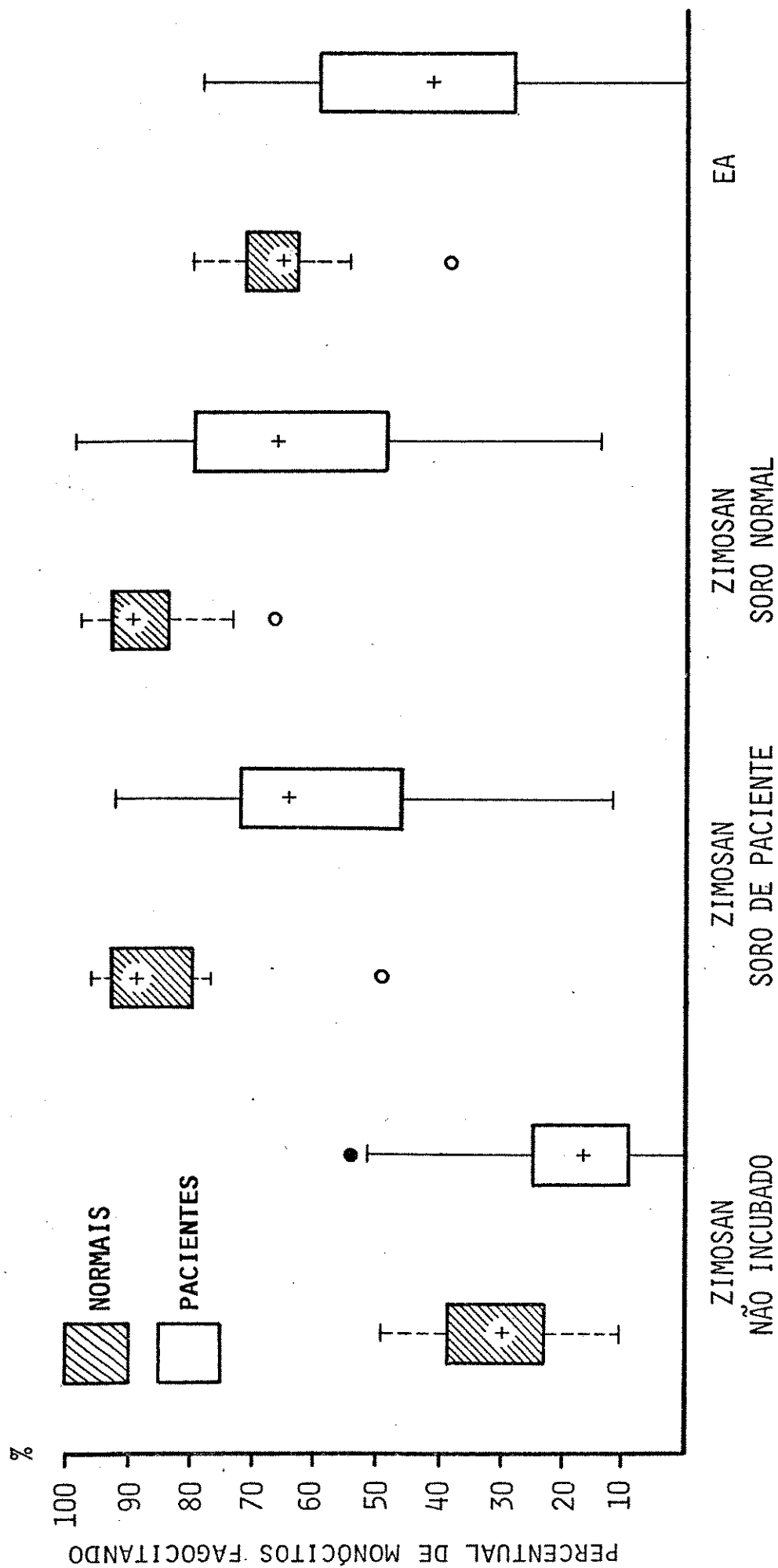


FIGURA 20 - ÍNDEX FAGOCITÁRIO DE MONÓCITOS DE INDIVÍDUOS NORMAIS E PACIENTES COM DOENÇA FALCIFORME. PROVAS REALIZADAS COM ERITRÓCITOS DE CARNEIRO SENSIBILIZADOS (EA) E PARTÍCULAS DE ZIMOSAN INCUBADAS OU NÃO COM SORO DE PACIENTE OU COM SORO NORMAL.

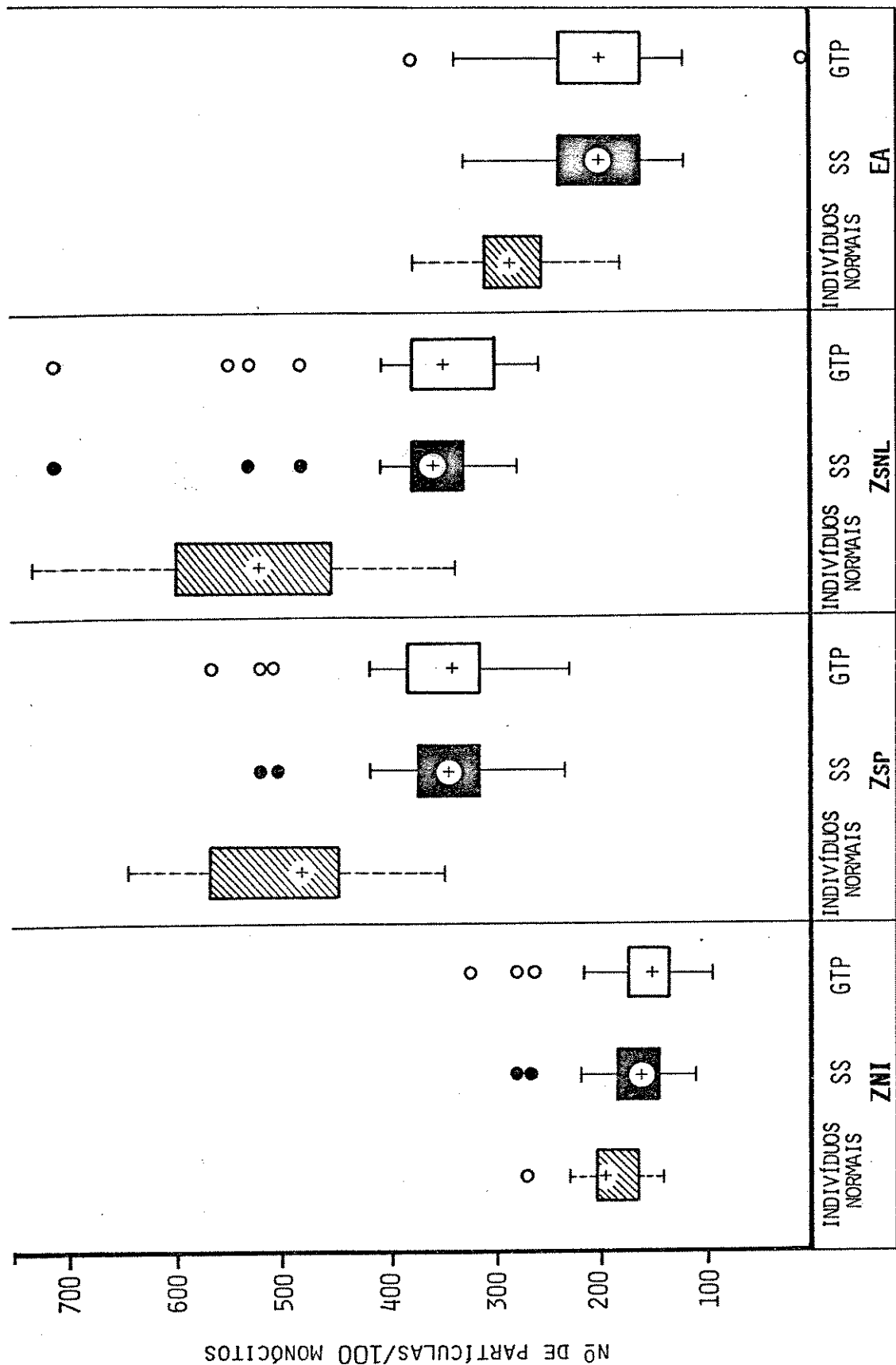


FIGURA 21 - CAPACIDADE FAGOCITÁRIA DE MONÓCITOS DO TOTAL DE PACIENTES COM DOENÇA FALCIFORME (GTP), DO GRUPO DE PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME (SS) E DE INDIVÍDUOS NORMAIS. PROVAS REALIZADAS COM ERITRÓCITOS DE CARNEIRO SENSIBILIZADOS (EA) E PARTÍCULAS, DE ZIMOSAN INCUBADAS OU NÃO (ZNI) COM SORO DE PACIENTE (ZSP) OU COM SORO NORMAL (ZSNL).

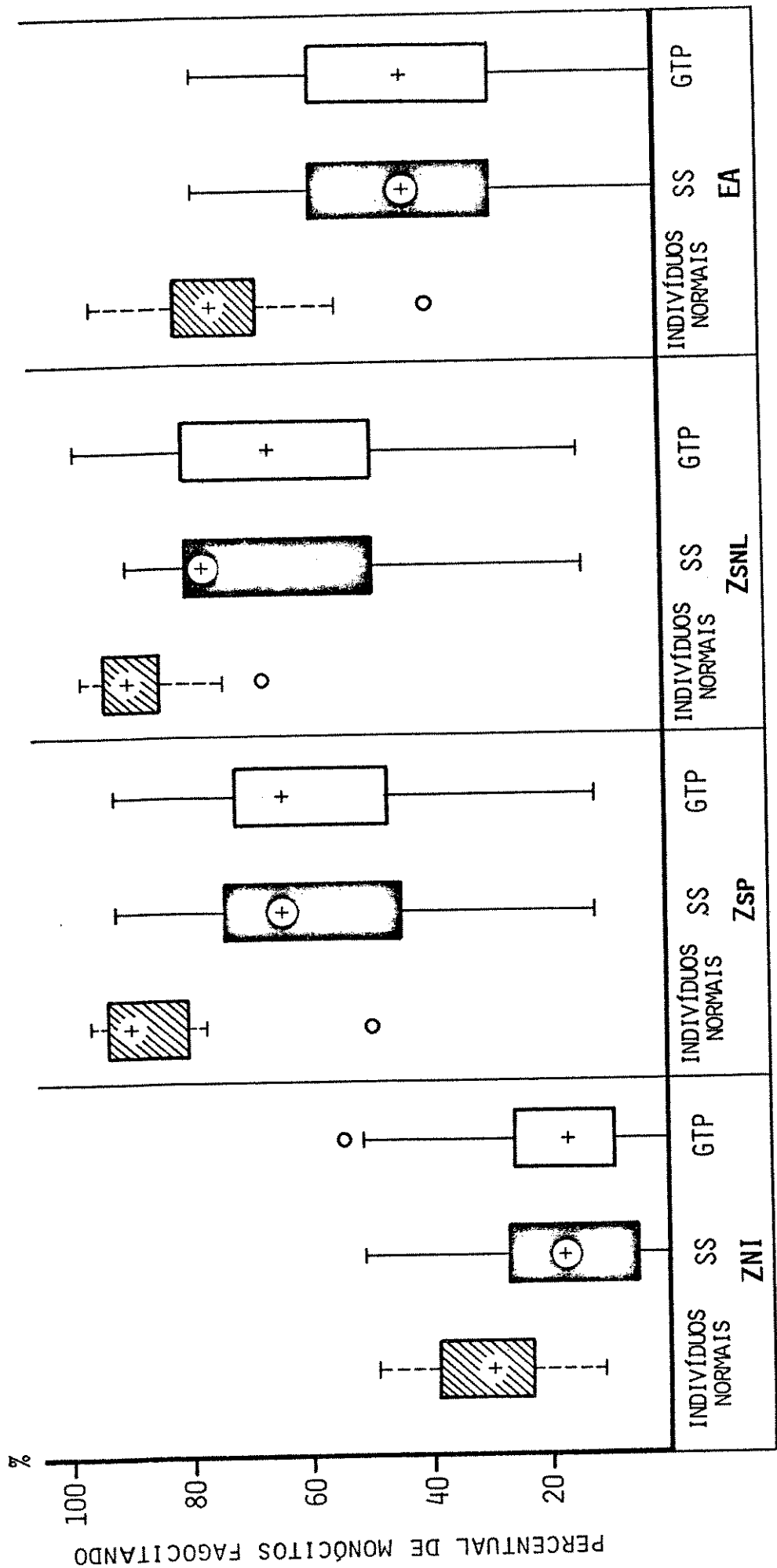


FIGURA 22 - ÍNDEX FAGOCITÁRIO DE MONÓCITOS DO TOTAL DE PACIENTES COM DOENÇA FALCIFORME (GTP), DO GRUPO DE PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME (SS) E DE INDIVÍDUOS NORMAIS. PROVAS REALIZADAS COM ERITRÓCITOS DE CARNEIRO SENSIBILIZADOS (EA) E PARTÍCULAS DE ZIMOSAN INCUBADAS OU NÃO (ZNI) COM SORO DE PACIENTE (ZSP) OU COM SORO NORMAL (ZSNL).

TABELA III - ÍNDEX FAGOCITÁRIO DE MONÓCITOS DE PACIENTES COM DOENÇA FALCIFORME E DE INDIVÍDUOS NORMAIS. PROVAS REALIZADAS COM ERITRÓCITOS DE CARNEIRO SENSIBILIZADOS (EA) E PARTÍCULAS DE ZIMOSAN INCUBADAS OU NÃO (ZNI) COM SORO DE PACIENTE (ZSP) OU COM SORO NORMAL (ZSNL).

P A C I E N T E S						I N D I V Í D U O S N O R M A I S					
PARTÍCULAS	MÉDIA	* DP	MEDIANA	VALOR MÍNIMO	VALOR MÁXIMO	PARTÍCULAS	MÉDIA	DP	MEDIANA	VALOR MÍNIMO	VALOR MÁXIMO
EA **N=36	43	20,2	42	0,0	78	EA N=28	75	11,6	75	39	94,5
ZSNL N=34	63,35	21,2	66	14	98	ZSNL N=24	88,7	7,18	89,6	66,5	96,6
ZSP N=34	61,26	19,3	64	12	92	ZSP N=25	85,88	9,87	89	49	96
ZNI N=32	18,47	14,3	16,5	0,0	54	ZNI N=22	30,54	10,1	30	11	49

* DP : DESVIO PADRÃO

** N : Nº DE INDIVÍDUOS ESTUDADOS.

TABELA IV - CAPACIDADE FAGOCITÁRIA DE MONÓCITOS DE PACIENTES COM DOENÇA FALCIFORME E DE INDIVÍDUOS NORMAIS. PROVAS REALIZADAS COM ERITRÓCITOS DE CARNEIRO SENSIBILIZADOS (EA) E PARTÍCULAS DE ZIMOSAN INCUBADAS OU NÃO (ZNI) COM SORO DE PACIENTE (ZSP) OU COM SORO NORMAL (ZSNL).

P A C I E N T E S						I N D I V Í D U O S N O R M A I S					
PARTÍCULAS	MÉDIA	*DP	MEDIANA	VALOR MÍNIMO	VALOR MÁXIMO	PARTÍCULAS	MÉDIA	DP	MEDIANA	VALOR MÍNIMO	VALOR MÁXIMO
EA **N=36	205,97	76,1	200	0,0	380	EA N=28	283,25	40,6	284	180	380
ZSNL N=34	376,32	89,1	350	260	710	ZSNL N=25	531,92	97,1	520	340	730
ZSP N=33	361,48	78,8	343	231	567	ZSP N=26	505,35	79,3	476	350	644
ZNI N=31	169,58	51,2	150	95	325	ZNI N=21	189,38	31,5	195	138	267

* DP : DESVIO PADRÃO

** N : Nº DE INDIVÍDUOS ESTUDADOS.

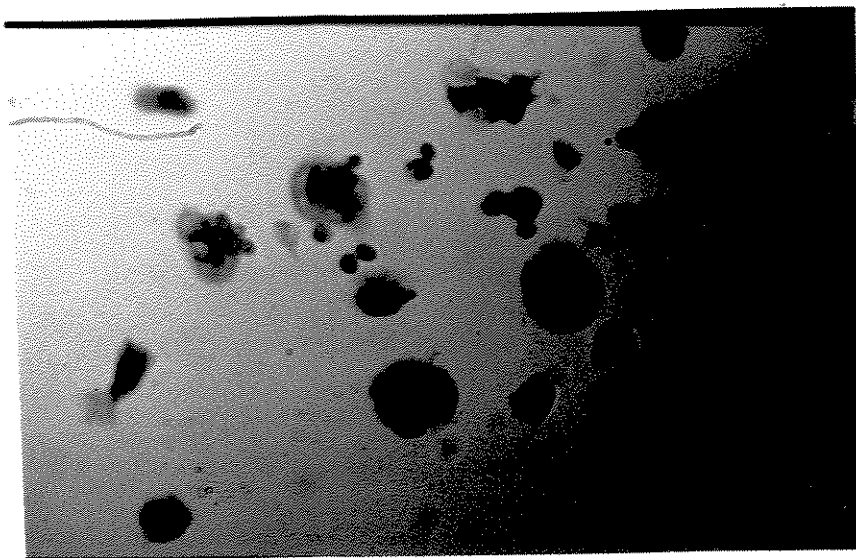


FIGURA 23 - ASPECTO DA FAGOCITOSE DE PARTÍCULAS DE ZIMOSAN PREVIAMENTE INCUBADAS COM SORO NORMAL. MONÓCITOS DE PACIENTE COM DOENÇA FALCIFORME (LEISHMAN -1000x)

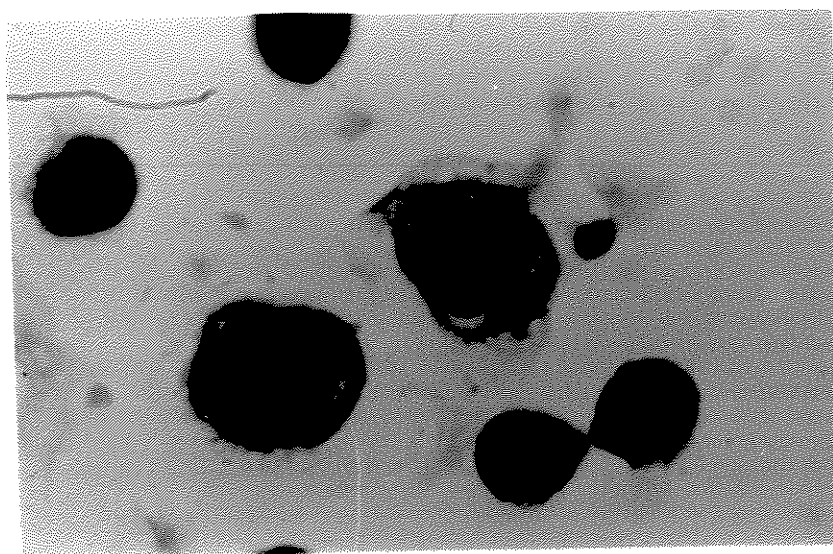


FIGURA 24 - ASPECTO DA FAGOCITOSE DE ERITRÓCITOS DE CARNEIRO INCUBADOS COM ANTICORPOS ANTI-ERITRÓCITOS DE CARNEIRO (EA). MONÓCITOS DE PACIENTE COM DOENÇA FALCIFORME (HE - 1000x).

4. MEDIDA DA FUNÇÃO ESPLÊNICA DOS PACIENTES COM DOENÇA FALCIFORME

A porcentagem média de hemácias com "pits" foi de 21,4% com desvio padrão de 10,6%. A mediana foi de 21%, sendo que apenas um paciente apresentou valor inferior a 5%, enquanto que 50% das crianças do grupo total se encontravam com valores superiores à mediana.

Não se observa diferença na distribuição das percentagens de "pits" quando o grupo total de paciente é separado por sexo (Figura 25). Entretanto, em relação à idade, observa-se uma correlação positiva da contagem de "pits" e este fator (Figura 26).

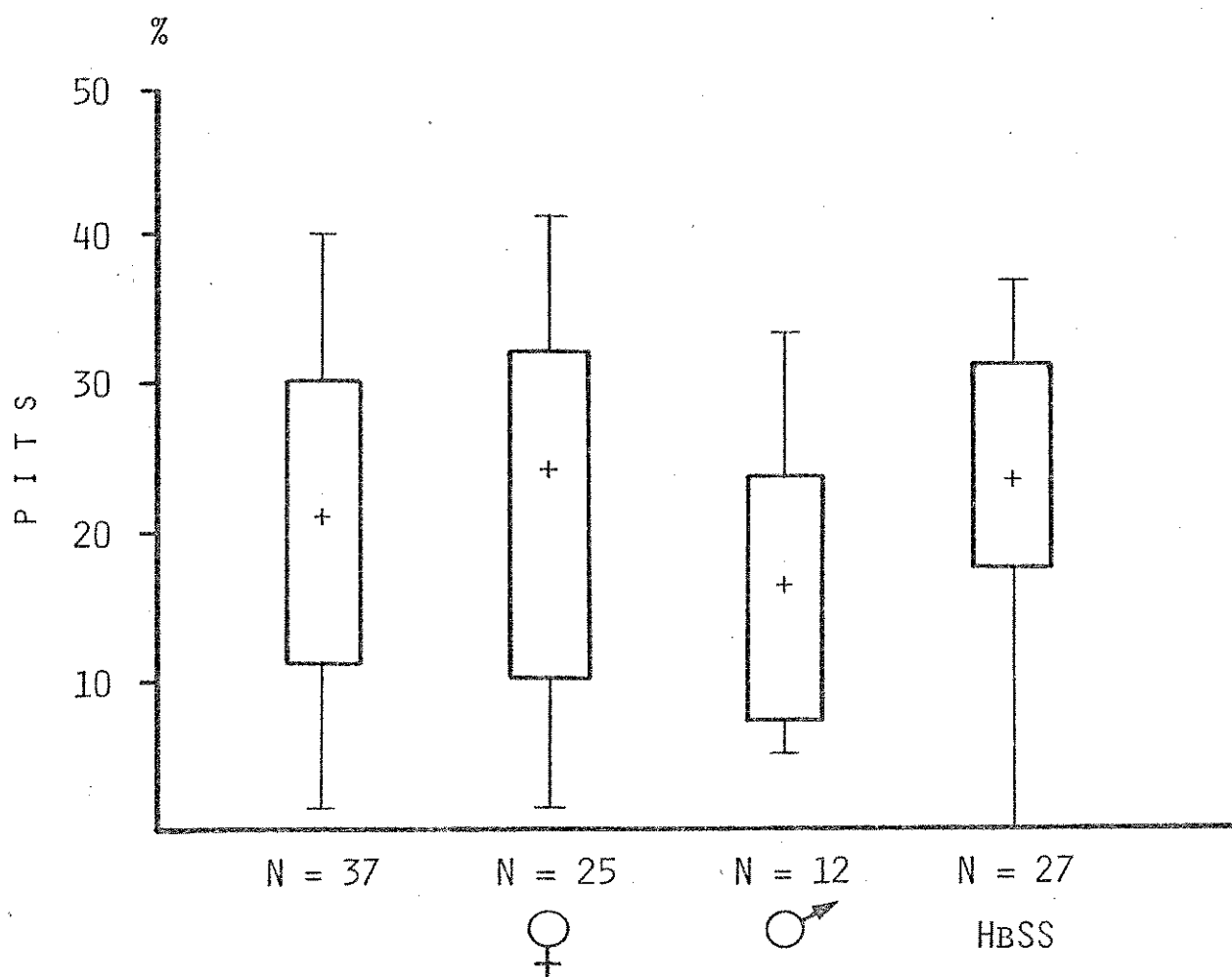


FIGURA 25 - CONTAGEM DE PITS NO TOTAL DE PACIENTES COM DOENÇA FALCIFORME E NO GRUPO DE PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME (SS), DISTRIBUIÇÃO CONFORME O SEXO.

N - Nº DE INDIVÍDUOS ESTUDADOS.

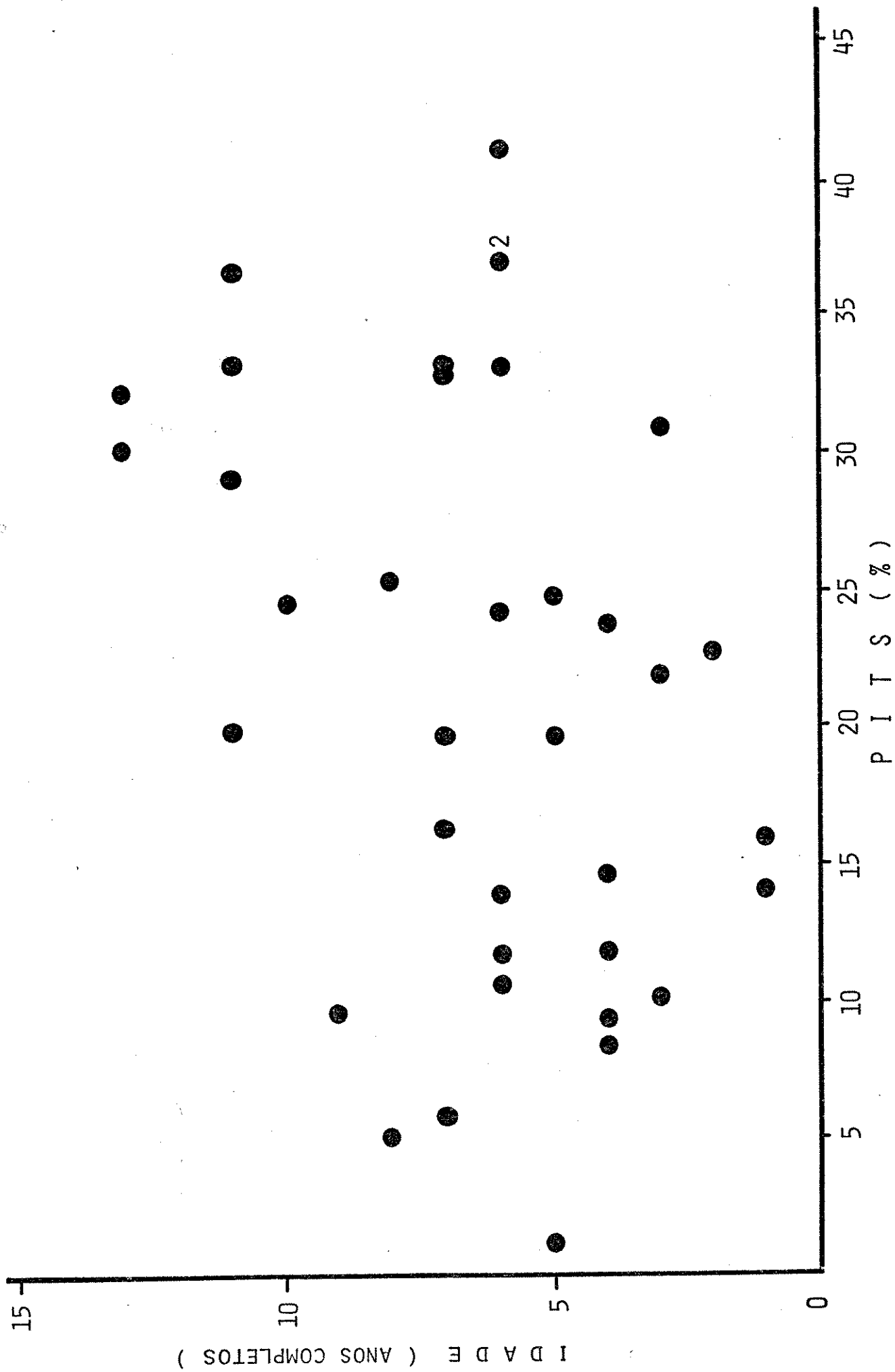


FIGURA 26 - CORRELAÇÃO ENTRE A PERCENTAGEM DE PITS E IDADE DOS PACIENTES.

IV - DISCUSSÃO

A infecção desencadeia uma série complexa de eventos, muitos dos quais ocorrem simultaneamente e estão interrelacionados em uma variedade de mecanismos. De modo simplista, podemos dizer que, enquanto os invasores são combatidos pelos sistemas não específicos da defesa, os elementos do sistema específico são convocados para o campo de batalha.

É sempre importante considerar que, embora provavelmente todos os fatores de imunidade específica sejam ativados em todas as infecções, a importância relativa dos elementos individuais varia com a biologia do microorganismo invasor e dentre os fatores do hospedeiro, os genéticos têm papel relevante.

As crianças com doença falciforme são muito mais vulneráveis às infecções por bactérias encapsuladas particularmente S.pneumoniae, N.meningitidis, H.influenzae e Salmonella sp. Por outro lado, sabe-se que a antigenicidade destas bactérias reside na fração polissacarídica de suas paredes celulares, e ainda, no caso da Salmonella sp., a sua caracterização como patógeno intracelular facultativo dos fagócitos mononucleares, as tornam resistentes ao processo de fagocitose. Sabe-se também que a imunidade para estes microorganismos está relacionada ao desenvolvimento de anticorpos anticapsulares específicos (FULGINITI & SIEBER, 1980).

Vale a pena lembrar, que o ácido teicóico polissacarídeo da parede bacteriana induz principalmente anticorpos da sub-classe IgG2 (OXELIUS, 1974; PABST & KRETH, 1980)

e a deficiência congênita de IgG4 está associada com a não formação de anticorpos anti-ácido teicóico e anti-H.influenzae, observando-se infecções recorrentes por esta bactéria (OXELIUS, 1974). Os anticorpos das sub-classes IgG1 e IgG3 anticapsulares específicos aumentam a fagocitose do S.pneumoniae (PROVVISOR & BAEHNER, 1980) enquanto, para os meningococos, a bacteriolise é significativamente importante na atividade contra estas bactérias (FULGINITI & SIEBER, 1980). Além desses aspectos, é importante lembrar também que os indivíduos com deficiência severa de imunoglobulinas são altamente suscetíveis às infecções por patógenos encapsulados como os pneumococos, meningococos e H.influenzae (OCHS & WEDGWOOD, 1980).

Em crianças saudáveis, estes microorganismos têm uma apreciável importância na morbidade e mortalidade durante a infância. O S.pneumoniae é o agente mais comum de pneumonia bacteriana (KLEIN, 1981) e otite média (BROOK, ANTHONY & FINEGOLD, 1978), após o primeiro ano de vida. Ele é responsável por uma estimativa de 1,7 casos de meningites e 9,5 casos de bacteremia por 100.000 pessoas anualmente nos EUA (BROOME e col., 1980), com estimativas superiores nas populações mais jovens. Em relação às meningites purulentas nas crianças entre dois meses e 5 anos de idade, apenas dez por cento foram devidas ao S.pneumoniae enquanto H.influenzae e N.meningitidis foram os causadores em 62% e 28% respectivamente de uma série de 680 pacientes. O pico de incidência de meningites por S.pneumoniae ocorreu antes de um ano de idade, sendo rara entre 1 e 4 anos.

O fato curioso dessas observações é que, ao contrário da população infantil normal, as crianças com hemoglobinopatia SS têm meningite devido ao S.pneumoniae entre 1 e 4 anos de idade (OVERTURE, POWARS & BARAFF, 1977), além de uma frequência 600 vezes maior em relação à população infantil da mesma faixa etária (BARRET-CONNOR, 1971).

Além desses aspectos epidemiológicos, se encontrou que crianças normais, especialmente aquelas abaixo de 2 anos de idade, apresentam uma menor resposta sorológica à imunização com os polissacarídeos capsulares de H.influenzae tipo b (ANDERSON e col., 1977; FULGINITI, 1980 e 1982), N.meningitidis grupos A e C (GOLD e col., 1976; PELTOLA e col., 1977; FULGINITI, 1980 e 1982) e de S. pneumoniae (COWAN e col., 1978; FULGINITI, 1980 e 1982). De modo semelhante, a soroconversão nas meningites causadas por H.influenzae tipo b (NORDEN e col., 1972) e por S.pneumoniae (PROBER e col., 1983), pneumonia por S.pneumoniae (FINLAND & SHUMAN, 1942; LEEDOM, 1982), são também reduzidas principalmente nesta faixa etária.

Estas vacinas polissacarídicas, em populações adultas e em crianças maiores de 2 anos, promovem proteção eficaz contra as infecções por S.pneumoniae (AUSTRIAN e col., 1976; COWAN e col., 1978; MÄKELÄ e col., 1980; FULGINITI, 1982), por N.meningitidis grupos A e C (FULGINITI, 1982) e para H.influenzae tipo b (FULGINITI, 1982), indicando que estas vacinas são de elevada imunogenicidade (FULGINITI, 1982).

As respostas mais reduzidas em anticorpos específicos para estes microorganismos ou para os polissacarídeos capsulares de suas paredes, devem decorrer da imaturidade dos mecanismos imunológicos nas crianças de baixa idade. As explicações propostas, baseiam-se nos seguintes aspectos:

a. imaturidade no processamento e apresentação do antígeno pelos fagócitos mononucleares (ARGYRIS, 1968, BLAISE, POPLACK & MUCHMORE, 1979; HAYWARD, 1981a; PABST & KRETH, 1980; COLE SARYAN & SMITH, 1981; INABA e col., 1982).

b. imaturidade intrínseca das células B (ANDERSON e col., 1981; CONLEY & COOPER, 1981; MIYAWAKI e col., 1981; COLE, SARYAN & SMITH, 1981).

c. aquisição tardia da capacidade de produzir sub-classes de IgG durante a infância, as quais se desenvolvem com velocidades diversas: IgG1 e IgG4 alcançam níveis de adultos por volta dos 8 anos, IgG3 aos 10 anos e IgG2, somente no início da adolescência (OXELIUS, 1979; SIBER e col., 1980).

d. desequilíbrio das atividades das células T auxiliadoras/supressoras, com predomínio da segunda (HAYWARD, 1981 b; MIYAWAKI e col., 1981; YACHIE e col., 1981; HAYWARD, 1983).

e. ausência de contato anterior com o agente infeccioso, e

f. antibioticoterapia precoce o que pode afetar a resposta imune para a infecção como tem sido demonstrado para o S.pyogenes (DAIKOS & WEINSTEIN, 1951).

Em relação às crianças com doença falciforme, sabe-se que elas respondem à imunização com os polissacarídeos capsulares do S.pneumoniae com a mesma magnitude das crianças normais da mesma idade e a proteção é mantida por, pelo menos, 2 anos (AMMAN e col., 1977). Em pacientes menores de 2 anos, a resposta à vacina revelou que as crianças entre 3 e 5 meses produzem anticorpos em títulos baixos, porém, o reforço aos 24 meses resulta em níveis semelhantes aos de adultos demonstrando a presença de memória imunológica (BUCHAMAN & SCHIFFMAN, 1980).

Portanto, é muito provável que a imaturidade do sistema imune própria da baixa idade nas crianças com doença falciforme possa contribuir também para esta elevada vulnerabilidade às infecções, ou que possa ocorrer uma interferência no desenvolvimento normal deste sistema por alterações de correntes do fenômeno de falcização. A asplenia funcional e conseqüente sobrecarga para os demais elementos do sistema reticuloendotelial decorrente da hemólise crônica, além da cinética anormal de neutrófilos, concentração elevada de ferro sérico e níveis baixos de transferrina (OVERTURF, POWARS & BARAFF, 1977) entre outros, somados, devem contribuir para a maior suscetibilidade às infecções nestas crianças.

Com exceção da asplenia funcional, as demais propostas de explicação para estas características epidemiológicas e clínicas das infecções na doença falciforme ainda não são suficientemente convincentes.

O papel do complemento na resposta inflamatória contra microorganismos é particularmente significativa em infecção meningocócica, na qual anticorpo sérico e complemento pode resultar em bacteriólise (FULGINITI & SIEBER, 1980). Uma relação entre concentração do complemento sérico reduzida e uma evolução desfavorável das infecções pneumocócicas tem sido observada em vários modelos experimentais em animais (WINKELSTEIN, SMITH & SHIN, 1975). Entretanto, esta relação não foi encontrada em crianças sem deficiência imunológica com meningites e bacteremias por S.pneumoniae (PROBER e col., 1983). Além disso, deficiência hereditária de C3 foi observada em heterozigotos que tinham aproximadamente 50% do nível normal desta proteína e estas pessoas eram completamente saudáveis, embora alguns mínimos defeitos nas funções de atividade hemolítica e da fagocitose de pneumococos opsonizados por anticorpos fossem subnormais. Por outro lado, apenas os pacientes com deficiência congênita de C3 ou de C3b inativador, com concentrações entre 1% a 2% da observada em indivíduos normais é que se tem demonstrado consistentemente uma elevada suscetibilidade às infecções meningocócicas principalmente, e, menos frequentemente às pneumocócicas (ROSEN & ALPER, 1980).

Outro aspecto importante é que embora defeitos na opsonização dos pneumococos tenham sido notados em alguns pacientes com doença falciforme (WINKELSTEIN & DRACHMAN, 1968; BJORNSEN, GASTON & ZELLNER, 1977), isto não tem sido demonstrado para a Salmonella choleraesuis (WINKELSTEIN & DRACHMAN, 1968) nem para a Salmonella enteritidis (FIELD, OVERTURF & STRUNK,

1981) ou para a Escherichia coli (BJORNSON, GASTON & ZELLNER , 1977), muito embora atividade bactericida de neutrófilos para a Salmonella typhimurium, na presença de soro de paciente ou de soro humano normal inativado, fosse reduzida, indicando uma deficiência no sistema complemento (HAND & KING, 1978).

É importante lembrar também que resultados muito variáveis como, atividade lítica normal de CH50 e C3 em doença falciforme (JOHNSTON, NEWMAN & STRUTH, 1973), valores baixos de C3 sem alteração da atividade lítica CH50 (BJORNSON, GASTON & ZELLNER, 1977), ou ainda, valores baixos de C3 e da atividade lítica CH50 (BJORNSON, LOBEL & LAMPKIN, 1980) e níveis de C3, C4 e CH50 normais (HERNANDEZ e col., 1983), exemplificam, em parte, a dificuldade de atribuir ao complemento, a maior suscetibilidade dos pacientes com doença falciforme às infecções bacterianas.

A coincidência da faixa etária de maior risco para as infecções bacterianas nos pacientes com doença falciforme e nas crianças sadias, deve ser analisada principalmente no que diz respeito ao desenvolvimento humoral e suas interações celulares.

Dentro dos mecanismos imunológicos propostos, este trabalho ocupou-se de um tópico pouco explorado que é o sistema dos fagócitos polimorfo e mononucleares em crianças com doença falciforme.

A participação fundamental do sistema fagocitá

rio nos mecanismos aferentes e eferentes da resposta imune , constitui um ponto crítico na expressão da imunocompetência principalmente nas funções de:

a. processamento e apresentação de antígenos , essenciais para a síntese de anticorpos e reações mediadas por células T. A indução da proliferação de linfócitos T requer sua associação física ou, através de mediadores solúveis, com os macrófagos conduzindo os antígenos;

b. controle genético da resposta imune, sendo os macrófagos o principal elemento;

c. aumentar a fagocitose e destruição de agentes infecciosos através de receptores sobre a membrana plasmática das células, tais como, para o fragmento cristalizável Fc de IgG e para C3; além disso, a defesa contra microorganismos intracelulares obrigatórios ou facultativos;

d. secretar uma série ampla de moléculas biologicamente ativas, as quais influenciam o desenvolvimento da via aferente da resposta imune, sendo do mesmo modo diretamente responsável pela maioria dos aspectos clínicos e patológicos de doenças crônicas alérgicas e inflamatórias (ROSENTHAL e col., 1980) .

A fagocitose, é precedida, pelo menos "in vivo" por um movimento quimicamente direcionado das células fagocitárias para o agente agressor, denominado quimiotaxia. De acordo com os conhecimentos atuais, esta migração direcionada depende da presença de fatores quimioatraentes, do reconheci-

to dos sinais quimiotáticos e da capacidade migratória intrínseca dos fagócitos.

A interpretação dos resultados obtidos no presente trabalho, quanto à quimiotaxia dos polimorfonucleares e monócitos, tomados em conjunto, falam a favor de uma competência intrínseca normal destas células para desempenhar esta função.

Verificou-se (Figuras 3 e 8) que a migração espontânea de monócitos e polimorfonucleares do sangue periférico do grupo de paciente é semelhante a migração dos mesmos tipos de células em crianças do grupo controle. Estes resultados demonstraram que a capacidade migratória intrínseca dos monócitos e polimorfonucleares do sangue periférico de crianças com doença falciforme está preservada. Do mesmo modo, a migração estimulada destas células, no grupo de pacientes, apresentou distribuição de valores semelhantes às do grupo controle, não tendo sido encontradas diferenças, mesmo quando a fonte de estímulos quimiotáticos foram gerados a partir de incubação de soros de pacientes com LPS.

O fato da migração estimulada ter sido muito superior à encontrada na migração espontânea, para os dois grupos de indivíduos, demonstra que a incubação do soro de paciente com a endotoxina, foi capaz de gerar um estímulo quimiotático eficiente e com a mesma potência do "pool" de soros normais incubado com a mesma endotoxina.

Desta maneira, pode-se inferir que nas condições experimentais utilizadas, a ativação da via alternativa do sistema complemento, necessária para esta função, está adequada, que fatores quimiotaticamente ativos foram gerados e ainda que, o reconhecimento para os sinais quimioatraentes pelo sistema receptor dos monócitos e polimorfonucleares estão adequadamente desenvolvidos e preservados nas crianças com doença falciforme.

A capacidade migratória dos fagócitos periféricos na doença falciforme foi pouco explorada até o momento. Quando este trabalho foi iniciado, dispunham-se apenas das investigações realizadas para polimorfonucleares.

Os nossos resultados são semelhantes aos de AKENZUA & AMIENGHEME, (1981), os quais investigaram a quimiotaxia de polimorfonucleares de crianças com hemoglobinopatia SS na fase estável da doença e como fonte quimiotática empregaram "pool" de soros normais e de pacientes incubados com lipopolissacarídeo. Posteriormente, DONADI, FALCÃO & BOTTURA (1983), mediram a migração de neutrófilos em pacientes com doença falciforme e encontraram-na normal.

Em relação a quimiotaxia de monócitos, os nossos resultados (o segundo da literatura) são semelhantes aos de MAHONEY & FERNBACH, (1983), os quais estudaram 18 crianças com doença falciforme na fase estável, utilizando o método modificado da câmara de BOYDEN e como fonte quimiotática soro AB normal ativado pelo zimosan.

O estímulo quimiotático utilizado em nosso trabalho deriva-se basicamente da ação de fatores do sistema complemento, uma vez que a incubação do soro humano fresco com endotoxina de *Escherichia coli* leva à ativação da via alternativa do complemento, gerando alguns produtos de clivagem com atividade quimioatraente para neutrófilos e monócitos, sendo o C5a, o mais potente (KLEIN, 1982b; HUDSON & HAY, 1983 ; WINKELSTEIN, 1983). Escolhemos este tipo de fator quimiotático com a finalidade de simular uma situação frequente "in vivo". A ativação da cascata do complemento pela via alternativa deve constituir um importante meio de recrutamento de fagócitos para o foco inflamatório.

Conforme é demonstrado em nossos resultados, há uma redução quantitativa no número porcentual de monócitos fagocitando assim como no número de partículas ingeridas por 100 células no grupo de pacientes em relação ao grupo controle. Esta redução, é observada nos dois tipos de situação experimental, e independente se a partícula, no caso do zimosan, tivesse sido opsonizada por soro de paciente ou "pool" de soros normais, sugerindo um defeito intrínseco celular (Figuras 19 e 20).

Esta suposição é confirmada, quando se demonstra que não houve diferença na distribuição dos valores para índice e capacidade fagocitárias dos monócitos nas crianças do grupo controle para as partículas de zimosan opsonizadas pelos soros de ambas as origens.

Portanto, a verificação da opsonização do zimosan ter sido equivalente pelo soro de ambas as origens é mais uma demonstração de que a via alternativa do complemento está intacta na doença em discussão.

O significado biológico deste resultado é muito importante. Quando o hospedeiro entra em contato pela primeira vez com um microorganismo, a via alternativa pode ser rapidamente ativada e a opsonização deste microorganismo se fazer pela deposição de componentes ou produtos de clivagem do sistema complemento sobre sua superfície, permitindo o seu reconhecimento por parte dos fagócitos (KLEIN, 1982c; WINKELSTEIN, 1983).

Nossos resultados sugerem que esta via deve estar funcionalmente adequada e,consequentemente,a atividade opsonica para o zimosan em crianças com doença falciforme, dentro da metodologia empregada, está preservada e com a mesma magnitude da observada no soro de crianças normais da mesma faixa etária.

De certo modo, nossos achados reforçam as pesquisas onde não foram detectadas alterações dos componentes da via alternativa do complemento ou defeitos de opsonização que implicassem na atividade desta via (PROVISOR, ALLEN & BAEHNER, 1976; STRAUSS e col., 1977). Estudos mais recentes confirmam também estes resultados.LACHER e col., (1982) verificam que a capacidade do soro de criança com doença falciforme para opsonizar zimosan estava reduzida em

apenas 15% dos pacientes (9 de 72 indivíduos) e na população controle a incidência deste defeito foi de 4,5%. Consequentemente, apenas uma minoria dos indivíduos com esta doença apresenta defeito na ativação da via alternativa do complemento. Além desses, outros autores como FIELD, OVERTURF & STRUNK, (1981) demonstraram que a opsonização da S. enteritidis é mediada predominantemente pela via alternativa e que nas crianças com doença falciforme avaliadas por estes investigadores, não foram detectadas nenhuma alteração.

Diante dos resultados encontrados por PROVISOR, ALLEN & BAEHNER, 1976; STRAUSS e col., 1977; FIELD, OVERTURF & STRUNK, 1981; LACHER e col., 1982 e os nossos, é muito pouco provável que defeitos funcionais da via alternativa do complemento, incluindo o fator B (WILSON, HUGHES & LACHMAN, 1976; WILSON, THOMAS & SISSON, 1979; DE CEULAER e col., 1981), estejam associados a uma maior suscetibilidade às infecções nesta doença. Reforçando esta observação, a medida do fator B por imunodifusão radial em pacientes com doença falciforme foi normal (BJORNSEN, GASTON & ZELLNER, 1977).

Os leucócitos fagocitários possuem sobre sua membrana plasmática receptores para Fc da IgG e para um produto de clivagem do componente C3 do sistema complemento. As partículas opsonizadas com C3 ou IgG, fixam-se aos receptores correspondentes sobre a membrana plasmática das células fagocitárias. Nós estudamos o papel destes ligantes, C3 e IgG, na fase

de ingestão da atividade fagocitária.

Enquanto os estudos da função dos neutrófilos em pacientes com doença falciforme, em especial nos portadores de anemia falciforme, têm-se ampliado, a função do fagócito mononuclear, recentemente, é que começou a ser investigada. Em relação aos polimorfonucleares, em doença falciforme, os estudos estão centralizados na atividade metabólica destas células, sendo encontrada reduzida (DIMITROV e col., 1972); WAJIMA, 1975; FALCÃO, VOLTARELLI & BOTTURA, 1981) ou normal (STRAUSS e col., 1976; HERNANDEZ e col., 1983); a capacidade bactericida foi encontrada elevada na fase estável da doença (WAJIMA, 1975) ou normal em pacientes sem história de infecção recorrente (DIMITROV e col., 1972) e em indivíduos com genótipo S/β (FALCÃO, VOLTARELLI & BOTTURA, 1981).

Sobre a função dos monócitos, encontramos duas publicações apenas. A primeira, do grupo de estudo cooperativo sobre doença falciforme em que se encontrou produção de superóxido reduzida em resposta ao zimosan ativado com soro de 19 crianças com hemoglobinopatia SS, enquanto 6 crianças submetidas a transfusões repetidas para manter o nível de HbS abaixo de 15%, apresentaram esta função normal (LUKENS e col., 1982). O segundo estudo, realizado por MAHONEY & FERNBACH, em 1983, se refere a fagocitose por monócitos de sangue periférico para Candida albicans e Candida pseudotropicalis incubados durante 15 e 30 minutos respectivamente, em 18 crianças na

fase estável da doença. Não houve diferença no número de partículas englobadas por 200 monócitos em relação ao grupo controle constituído por adultos. Entretanto, os resultados destes pesquisadores demonstraram capacidade fagocitária extremamente baixa (0,7 a 0,8 partículas por monócito) em relação aos nossos valores. Contudo, os métodos laboratoriais, em especial o tipo de partícula empregada, foram bastante diferentes dos utilizados em nossa pesquisa, para tal comparação.

No que se refere a fagocitose via Fc, onde se utilizaram eritrócitos de carneiro (E) opsonizados com anticorpos de coelho anti-E, de classe IgG, nas crianças com doença falciforme, os valores encontrados em nosso trabalho demonstram, uma redução em relação ao grupo controle. Mais uma vez, estes resultados falam a favor de um defeito intrínseco celular.

O papel biológico da fagocitose via receptores para Fc é de fundamental importância. Um dos mecanismos de defesa mais relevante contra bactérias, principalmente gram positivas, é a opsonização através da IgG, que se liga à parede bacteriana pelos Fab ("antigen binding fragment"), deixando exposto o Fc que, por sua vez, pode ser reconhecido por receptores específicos presentes na superfície dos fagócitos, polimorfo e mononucleares. Forma-se assim uma ponte entre o fagócito e o microorganismo a ser fagocitado, passo fundamental para que ocorra o englobamento e, em seguida, a destruição intra-celular da bactéria (ZEMBALA, 1981; KLEIN, 1982c; SEGALL

& SOOTHILL, 1983). Na literatura pertinente não foi encontrado estudo referente a fagocitose via Fc na doença falciforme.

Os mecanismos para explicar o possível defeito intrínseco dos monócitos periféricos para a função fagocitária permanecem essencialmente especulativos. A redução dos valores encontrados no índice e capacidade fagocitárias dos monócitos de pacientes em ambas as condições experimentais, não pode ser atribuído, ao fator idade por dois motivos: em primeiro lugar o pareamento por idade foi efetivo, tendo em vista que a análise de regressão das variáveis contra este fator não revela influência nas respostas; em segundo lugar, desde o nascimento os monócitos já possuem receptores Fc e C3 em uma proporção equivalente a de monócitos de adultos (BERMAN & JOHNSON, 1980; CARNEIRO - SAMPAIO, 1984).

O fato de os monócitos de pacientes apresentarem índice e capacidade fagocitárias menores, também, não deve ser decorrente de opsonização deficiente do zimosan e eritrócito de carneiro, visto que estas partículas foram eficientemente englobadas pelos monócitos das crianças do grupo controle. Contudo, é possível se aventar a hipótese de que haja uma menor densidade ou menor afinidade ou até mesmo alteração na integridade dos receptores para Fc e C3 dos monócitos das crianças com doença falciforme, de acordo com a teoria do "ziper", ocorrendo conseqüentemente, uma fagocitose reduzida, mesmo estando as partículas adequadamente opsonizadas. Esta hipótese baseia-se nas investigações de

GRIFFIN e col., 1975), quando demonstraram que a ligação de uma partícula aos receptores específicos sobre a membrana plasmática do macrófago não é suficiente para desencadear a sua ingestão. Esta fase requer uma interação circunferencial sequencial dos ligantes ou opsoninas, C3 e IgG, ligados às partículas com receptores de membrana plasmática específicos não envolvidos no processo de fixação inicial.

Esta hipótese poderia começar a ser testada através de imunofluorescência, utilizando-se um soro anti-receptor para C3 e para Fc. Outra maneira de testá-la seria proceder à incubação à 4°C dos monócitos com as partículas opsonizadas, ao invés de 37°C, para analisar a capacidade de aderência, visto que esta fase do processo de fagocitose não requer energia metabólica enquanto que a fase de englobamento é altamente dependente da temperatura e requer metabolismo celular ativo (GRIFFIN e col., 1975).

Outro meio de avaliar o estado dos receptores Fc de monócitos, seria utilizar a reação de citotoxicidade celular dependente de anticorpo (conhecida como ADCC) em monócitos destes pacientes, visto que neste mecanismo imunológico, diferente da fagocitose, o reconhecimento da célula estranha é feito através do mesmo tipo de receptor. Assim, mais um mecanismo de defesa do paciente poderá provavelmente estar comprometido.

A metodologia utilizada no presente trabalho

para estudo da fagocitose por monócitos, avalia uma fase intermediária de um processo que é convenientemente separado em cinco estágios: reconhecimento e aderência da partícula, englobamento, degranulação, morte ou destruição do microorganismo ou partícula estranha e exocitose (KLEIN, 1982c). Incapacidade em qualquer uma destas fases torna o indivíduo mais suscetível às agressões. É possível, portanto, que fases anteriores à ingestão ou posteriores, possam estar comprometidas nas crianças com doença falciforme, merecendo serem investigadas.

Poderíamos lembrar, para explicar um tipo de defeito intrínseco celular, os estudos "in vitro" que demonstram, em neutrófilos humanos, uma acentuada deficiência na capacidade de polimerizar a proteína contrátil-actina e em consequência apresentam defeito na fagocitose. Esta deficiência de origem provavelmente genética, suplementa outras evidências de que o estado polimerizado desta proteína é importante para uma fagocitose eficiente. Este é um exemplo de que alterações em qualquer das fases do processo da fagocitose leva conseqüentemente a um defeito nesta função (STOSSEL, 1977).

Embora, a explicação a seguir não seja imediatamente óbvia para ser extraída dos nossos resultados sobre fagocitose, diante dos conhecimentos atuais, o estudo da expressão dos antígenos DR sobre os monócitos de pacientes com doença falciforme torna-se relevante, visto que o ma

crófago é o local principal da expressão do controle genético na resposta imune (ROSENTHAL e col., 1980). Alguns monócitos e macrófagos humanos possuem antígenos semelhantes aos antígenos Ia dos monócitos e macrófagos de camundongos. Estes antígenos são codificados por genes dentro do sistema HLA ou intimamente ligados a sub-região D do complexo de histocompatibilidade maior e são denominados HLA-DR. Recentemente, este aspecto foi explorado em recém-nascidos humanos, tendo TWEARDY e col., (1981) e STIEHM e col., (1984), observado uma porcentagem de monócitos de cordão umbilical, com expressão de antígenos HLA-DR na superfície celular. A expressão diminuída destes antígenos podem explicar as respostas humoral e citotóxica deficientes por parte da criança jovem, como resultado da dificuldade de apresentação do antígeno, uma vez que os marcadores celulares em questão são essenciais para as interações entre macrófagos e linfócitos (ROSENTHAL e col., 1980; STIEHM e col., 1984). Em camundongos recém-nascidos, LU, CALAMAI & UNANUE, 1979, conseguiram correlacionar a incapacidade de apresentar antígeno por parte dos macrófagos com o menor número destas células portando antígenos Ia na membrana.

A hipótese de defeito no processamento do antígeno pelos fagócitos mononucleares, para explicar a reduzida resposta em anticorpo específico às infecções por S.pneumoniae na criança imunologicamente normal (COLE, SARYAN & SMITH, 1981), deve ser portanto considerada também nas crian-

ças com doença falciforme. O apoio a esta hipótese surge de dois fatos: da resposta à imunização com polissacarídeos capsulares de pneumococos em crianças com doença falciforme, o que lhe confere proteção e memória imunológica (AMMAN e col., 1977, BUCHANAN & SCHIFFMAN, 1980) e da falta de um controle adequado da infecção natural por S.pneumoniae, havendo geralmente um desenrolar fatal. O fato ainda, da antigenicidade destas bactérias residir na fração polissacarídica de suas capsulas, fortalece a hipótese de que a dificuldade no controle da infecção possa estar localizada na incapacidade de processamento e apresentação desses antígenos.

Uma outra possibilidade é a de que haja um desequilíbrio nas subpopulações de monócitos periféricos, nestes pacientes. Segundo a opinião de alguns pesquisadores, a diversidade de funções exercidas pelo sistema dos fagócitos mononucleares em indivíduos normais tem explicação baseada no achado de que estas células respondem de modos variados a um número de estímulos diferentes. Alguns destes estímulos podem ser produzidos pelos próprios fagócitos mononucleares, aumentando a possibilidade de que estas células sejam autoregulatórias (RUSSELL, 1982). Vários pesquisadores, para melhor entender a diferenciação e função desta importante linhagem de células, têm trabalhado no sentido de caracterizar marcadores antígenos específicos de superfície, os quais distinguem membros da linhagem humana dos monócitos/ macrófagos. Vários antígenos sobre estas células, detectadas por painéis

de anticorpos monoclonais parecem delinear estágios de diferenciação do macrófago e estão sendo usados para determinar características funcionais das células que os portam (IANCOCK, ZOLA & ATKINS, 1983; TODD & SCHLOSSMAN, 1982).

Há algumas evidências de que a eritrofagocitose interfere com a capacidade dos macrófagos teciduais de simultaneamente fagocitar e destruir certas bactérias intracelulares e este fenômeno pode estar relacionado com a elevada frequência de infecções em pacientes com doença falciforme (GOLDE, 1975). Se fatores semelhantes também afetam os fagócitos mononucleares circulantes, é desconhecido. Nós demonstramos pela primeira vez que a capacidade e índice fagocitários via receptores para Fc e C3 estão reduzidos para monócitos de sangue periférico recentemente colhidos. É muito provável que a função fagocitária por parte do sistema monócito-macrófago esteja saturada (ou sobrecarregada) devido principalmente à hemólise crônica e pelo comprometimento funcional do baço nestes pacientes, podendo ser esta uma explicação para nossos resultados. Isto, e mais o fato de que não existe a reentrada dos monócitos na corrente sanguínea uma vez que eles deixaram a circulação, ajudam estes argumentos (CLINE, 1978). Portanto, o desvio do sistema fagocitário mononuclear, para a tarefa de eliminar eritrócitos lesados da medula óssea, do baço e da circulação poderia levar este sistema a uma exaustão, nos pacientes com doença falciforme (GOLDE, 1975; STOSSEL, 1977).

baço de processamento de antígeno e formação de anticorpos . Os autores supõem que a fagocitose e o processamento da hemoglobina S polimerizada requer um gasto excessivo de energia metabólica pelas células reticuloendoteliais, o que, eventualmente resultaria em lesão permanente e destruição destas células. Isto ocorrendo em um período crítico, coincidente com aquele durante o qual as células T auxiliares/ indutoras aprenderiam a reconhecer anticorpo anticapsular e promoveriam a formação da subclasse IgG₂, manteria a imaturidade imunológica em crianças maiores com anemia falciforme semelhante à de crianças normais abaixo de 6 meses de idade.

Embora não conste no capítulo de resultados, realizamos a análise estatística entre os indicadores de morbidade na doença falciforme tais como HbF (hemoglobina fetal) e "pits" com os valores de índice e capacidade fagocitárias dos monócitos encontrados no grupo de pacientes. Não observamos nenhuma correlação linear entre estes indicadores e os nossos resultados de fagocitose. Os valores encontrados são, portanto, independentes e este achado é muito importante quando analisado sob o conhecimento de que há um nível de HbF acima do qual a gravidade da doença falciforme diminui (POWARS e col., 1984), havendo uma associação positiva entre a manutenção da função esplênica e níveis de HbF maiores de 18% (POWARS e col., 1984). Contudo, uma relação entre os valores de HbF e os eventos clínicos recorrentes, tais como, síndrome aguda de tórax, meningites/ septicemias e admissão

hospitalar, demonstraram um padrão errático de risco correlativo para aqueles pacientes com HbF abaixo de 20% (POWARS e col., 1984).

Os resultados aqui apresentados fazem supor que, doença atribuível às anormalidades séricas, não podem ser equivocadamente restritas a uma falha na opsonização. Muito embora algumas generalizações clínicas sejam consistentes com a idéia de que as anormalidades correspondentes de opsonização "in vitro" tenham uma relação causal para o estado patológico da suscetibilidade à infecção, muitos fatores séricos envolvidos em opsonização direta ou indiretamente podem influenciar as funções dos fagócitos circulantes.

Em nosso estudo encontramos uma quimiotaxia de monócitos e polimorfonucleares normais, capacidade sérica opsônica para o zimosan e geração de fatores quimiotáticos normais, embora os fagócitos mononucleares apresentassem "in vitro" deficiente capacidade de ingestão. A anormalidade encontrada reflete um defeito das células e, embora não tenham sido detectados fatores séricos envolvidos, outros fatores micro-ambientais podem estar relacionados. Se o fenômeno encontrado neste trabalho é hereditário ou secundário, não pode ainda ser respondido. Porém, a maior vulnerabilidade às infecções não ocorre em todas as crianças com a doença falciforme, como também, aquelas mais suscetíveis iniciam os sintomas a partir dos 6 meses de idade.

Sugerimos que a elevada suscetibilidade das crianças com doença falciforme às infecções bacterianas específicas pode resultar da ação somatória de vários aspectos.

I- Fatores da ontogenia normal do sistema imune: a) imaturidade intrínseca dos linfócitos B nos dois primeiros anos de vida, imaturidade esta traduzida por capacidade reduzida de síntese de IgG e paralelamente função T auxiliadora também deficiente (HAYWARD, 1981a); b) produção de anticorpos anticapsulares específicos reduzidos e conseqüente redução na capacidade opsonizante do soro. II- Fatores decorrentes do fenômeno de falcização: a) asplenia funcional; b) Hemólise crônica e conseqüente saturação do sistema reticulo-endotelial; c) infartos de medula óssea comprometendo, talvez, a unidade formadora de colônia para granulócitos e monócitos; d) defeito na atividade funcional dos neutrófilos; e) defeito na função fagocitária de monócitos do sangue periférico.

V - RESUMO E CONCLUSÕES

A morbidade por infecção nos portadores de doença falciforme é elevada, não estando ainda completamente elucidadas as causas deste fato. Os estudos imunológicos concentram-se na função esplênica, na atividade da via alternativa do complemento e, recentemente, na função fagocitária.

O presente trabalho compreende o estudo do sistema fagocitário em crianças com doença falciforme, durante a fase estável. Seu objetivo principal foi o de avaliar a função dos fagócitos polimorfo/mononucleares e da atividade sérica opsonica, na expressão da imunocompetência dessas crianças, e conhecer, pelo menos em parte, o que as predispõe à elevada suscetibilidade às infecções graves, especialmente por organismos com cápsulas polissacarídicas, tais como os pneumococos.

Avaliaram-se a quimiotaxia de polimorfonucleares e monócitos periféricos, pela técnica das câmaras de Boyden modificada e a capacidade fagocitária de monócitos para eritrócitos de carneiro (E) incubados com anticorpos (A) de classe IgG de coelho anti-E (detecção de receptores para Fc da IgG) e para partículas de zimosan incubadas com soro humano fresco (detecção de receptores para C3). Um grupo de crianças saudáveis, pareadas por idade ao grupo de pacientes, serviu como controle. A atividade quimiotática de polimorfonucleares e monócitos de pacientes mostrou-se equivalente à do grupo controle. A fagocitose para partículas EA e de zimosan pelos monócitos de pacientes foi reduzida em relação à do grupo controle. No entanto, o soro de pacientes mostrou potência semelhante ao soro normal, tanto na geração de fator quimiotático, pela incubação com uma endotoxina bacteriana, como na opsonização

do zimosan. Através das anormalidades morfológicas dos eritrócitos sob microscopia de contraste de interferência direta, estimou-se a função de "pitting" do baço, encontrando-se valores elevados de "pits" em todos os pacientes, o que demonstra comprometimento do principal órgão linfóide secundário envolvido na função fagocitária.

Os resultados obtidos permitem as seguintes conclusões:

1- Os monócitos periféricos das crianças com doença falciforme mostraram uma atividade quimiotática semelhante às mesmas células de crianças sadias.

2- À semelhança dos monócitos, os polimorfonucleares periféricos das crianças com doença falciforme apresentaram a mesma atividade quimiotática dos polimorfonucleares de crianças sadias.

3- O índice e a capacidade fagocitária de monócitos das crianças com doença falciforme mostraram-se reduzidos em relação à de monócitos de crianças sadias, para eritrócitos de carneiro incubados com anticorpos de coelho, de classe IgG, anti-eritrócitos de carneiro e, para partículas de zimosan, o que demonstra deficiência nestas funções.

4- Houve comprometimento da função esplênica em todos os pacientes estudados, detectando-se uma correlação positiva entre os valores de "pits" encontrados e a idade dos pacientes.

5- O soro de pacientes apresentou, quando comparado a soro normal, a mesma capacidade em gerar estímulo quimioatraente para monócitos e polimorfonucleares de crianças sadias e em opsonizar partículas de zimosan.

6- O pareamento por idade para estudo das funções de quimiotaxia e fagocitose foi efetivo, uma vez que a análise de regressão das variáveis estudadas contra idade , nos dois grupos de indivíduos, não revela que este fator influencia as respostas.

VI - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADDIEGO, J.E.JR. ; MANDEL, M. ; VICHINSKY, E.P. & LUBIN - BERTRAN, H.- Changing pattern of septicemia in sickle cell disease: Possible effect of pneumococcal immunization. *Pediatr. Res.*, 15 : 606; 1981.
- ADES, E.W. ; HINSON, A. & MORGAN, S.K. - Immunological studies in sickle cell disease I. analysis circulating T - lymphocyte subpopulations. *Clin. Immunol. and Immunopathol.*, 17: 459-462 , 1980.
- ADEYOKUNNU, A.A. & HENDRICKSE, R.G. - Salmonella osteomyelitis in childhood. *Arch. Dis. Child.*, 55 : 175-184, 1980.
- ADINOLFI, M. - Ontogeny of Complement, Lysozyme and Lactoferrin in man. In: LAMBERT, H.P. & WOOD, C.B.S. Immunological aspects of infection in the fetus and newborn. London, Academic Press , 1981. p. 19-52.
- AHONKHAI, V.I. ; LANDESMAN, S.H. ; FIRKRIG, S.M. ; SCHMALZER, E. A. ; BROW, A.K. ; CHERUBIN, C.E. ; SCHIFFMAN, G. - Failure of pneumococcal vaccine in children with sickle - cell disease. *Medical Intelligence*, 301: 26-27, 1979. ,
- AIBENDER, E. ; CABATU, E.E. ; GUZMAN, D.M. & SWEET, A.Y. - Serum C - reactive proteins and problems of newborn infants. *J. Pediatr.*, 101: 438-443, 1982.

- AKENZUA, I.G. & AMIENGHEME, O.R. - Inhibitor of in vitro neutrophil migration in sera of children with homozygous sickle cell gene during pain crisis. Brit. J.Haematol., 47 : 345-352, 1981.
- ALTMAN, L.C. - Chemotactic Lymphokines: a review. In : GALLIN, J. I. & QUIE, P.G. New York, Raven Press, 1978. p. 267-286.
- AMMANN, J.A. ; ADDIEGO, J. ; WARA, D.W. ; LUBIN, B. ; SMITH, N. B. & MENTZER, W.C. - Polyvalent pneumococcal - polysaccharide immunization of patients with sickle - cell anemia and patients with splenectomy. N.Engl. J.Med., 297: 897-900, 1977.
- ANDERSON, P. ; SMITH, D.H. ; INGRAM, D.L. ; WILKINS, J. ; WHERLE, P.F. & HOWIE, V.M. - Antibody to polyribophosphate of Haemophilus influenzae type b in infants and children: Effect of immunization with polyribophosphate. J.Infect. Dis., 136: 57-62, 1977.
- ANDERSON, V. ; BIRD, A.G. ; BRITTON, S. & PALACIOS, R. - Humoral and cellular immunity in humans studied at the cell level from birth to two years of age. Immunological Rev., 57: 5-38, 1981.
- ARGYRIS, B.F. - Role of macrophage in immunological maturation. J. exp. med., 128: 459-464, 1968.

AUSTRIAN, R. ; DOUGLAS, R. ; SCHIFFMAN, G. ; COETZEE, A.M. ; KOORNHOF, H.J. ; HAYDEN-SMITH, S. & REID, R.D.W. - Prevention of pneumococcal pneumonia by vaccination. Trans. Assoc. Am. Physicians, 89: 184-194, 1976.

AZEVEDO, E. - Historical note on the inheritance of sickle-cell anemia. Am. J. hum. Genet., 25: 457-458, 1973.

BALFANZ, J.R. ; NESBIT, M.E.JR. ; JARVIS, C. & KRIVIT, W. - Overwhelming sepsis following splenectomy, A.J.Med. Sci., 270: 523-530, 1975.

BALLAS, S.K. ; BURKA, E.R. ; LEWIS, C.M. & KRASNOW, S.H. - Serum immunoglobulin levels in patients having sickle cell syndromes. Am. J. Clin. Pathol., 73: 394-396, 1980.

BARNARD, D.R. & ARTHUR, M.M. - Fibronectin (cold insoluble globulin) in the neonate. J. Pediat., 102 : 453-455, 1983.

BARRET - CONNOR, E. - Bacterial infection and sickle cell anaemia. An analysis of 250 infections in 166 patients and a review of the literature. Medicine, 50: 97-112, 1971.

BELLANTI, J.A. & HURTADO, R.C. - Immunology of the fetus and newborn. In: AVERY, G. ed. Diseases of the Newborn. Philadelphia , Lippincott, 1975. p. 521-536.

- BERG, T. & JOHANSSON, S. G. O. - Immunoglobulin levels during childhood, with special regard to IgE. *Acta Paediat. Scand.*, 58 : 513-524, 1969.
- BERMAN, J. D. & JOHNSON, W. D. - Monocyte function in human neonates. *Infection and Immunity*, 19: 898-902, 1980.
- BESSIS, M. & DELPECH, G. - Sick cell shape and structure: Images and concepts (1840-1980). *Blood cells*, 8: 339-435, 1982.
- BLACK, P. F. ; KUNZ, L. J. & SWARTZ, M. N. - Salmonellosis a review of some unusual aspects. *N. Engl. J. Med.*, 262: 811-817, 1960.
- BLAESE, R. M. ; POPLACK, P. G. & MUCHMORE, A. V. - The mononuclear phagocyte system: role in the expression of immunocompetence in neonatal and adult life. *Pediatrics*, 64 (suppl.) : 829-833, 1979.
- BJORNSON, A. B. ; GASTON, M. H. & ZELLNER, C. L. - Decreased opsonization for Streptococcus pneumoniae in sickle cell disease : Studies on selected complement components and immunoglobulins . *J. Pediat.*, 91: 371-378, 1977.
- BJORNSON, A. B. ; LOBEL, J. S. & LAMPKIN, B. C. - Humoral components of host defense in sickle cell disease during painful crisis and asymptomatic periods. *J. Paediatr.*, 96: 259-262, 1980.
- BOGGS, D. ; HYDE, F. & SRODES, C. - An unusual pattern of neutrophil kinetics in sickle cell anemia. *Blood*, 41: 59-65, 1973.

- BOYDEN JR., S.V. - The chemotatic effect of mixtures of antibody and antigen in polymorphonuclear leukocytes. J.Exp. Med., 115 : 453-466, 1962.
- BROOK, I. ; ANTHONY, B.F. & FINEGOLD, S.M. - Aerobic and anaerobic bacteriology of acute otitis media in children. J. Pediatr., 92: 13 - 15, 1978.
- BROOME, C.V. ; FACKLAM, R.R. ; ALLEN, J.R. & FRASES, D. W. - Epidemiology of pneumococcal serotypes in the United States, 1978 - 1979. J.Infect. Dis., 141: 119 - 123, 1980.
- BUCHANAN, G.R. & SCHIFFMAN, G. - Antibody responses to polyvalent pneumococcal vaccine in infants with sickle cell anemia. J. Pediatr., 96: 264-266, 1980.
- BUCHANAN, G.R. ; SMITH, S.J. ; HOLTKAMP, C.A. & FUSELER, J.P. - Bacterial infection and splenic reticuloendothelial function in children with hemoglobin SC disease. Pediatrics, 72 : 93-98, 1983.
- CAGGIANO, V. & HOLDEN, D. - Serum immunoglobulin levels in patients with sickle cell disease. Clin. Chim. Acta, 21: 265-269, 1968.
- CARNEIRO SAMPAIO, M.M.S. - Função monocitária em recém-nascidos normais. São Paulo 1984 (Tese de livre docência. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo).

CARRINGTON, C.L. & DAVISON, W. C. - Multiple osteomyelitis due to bacillus paratyphosus B : Demonstration of baccillus in fresh blood preparation. Bull. John Hopkins Hosp., 36: 428-430 , 1925.

CASPER, J. T. ; KOETHE, S. ; RODEY, G. E. & THATCHER, G. - A new method for studying splenic reticulo endothelial dysfunction in sickle cell disease patients and its clinical application : A brief report. Blood, 47: 183 - 188, 1976.

CHARACHE, S. & RICHARDSON, S. N. - Prolonged survival of a patient with sickle cell anemia. Arch. Inter. Med., 113: 844 - 849 , 1964.

CLINE, M. J. ; LEHRER, R. I. ; TERRITO, M. C. & GOLDE, D. W. - Monocytes and macrophages: functions and diseases. Ann. Inter . Med., 88: 78-88, 1978.

COLE, F. S. ; SARYAN, J. A. ; SMITH, A. L. - The risk of additional systemic bacterial illness in infants with systemic Streptococcus pneumoniae disease. J. Pediatr., 99: 91 - 94, 1981.

- COLOMBO, B. & MARTINEZ, G. - Haemoglobinopathies including thalassaemia. Part. 2. Tropical America. Clin. Haematol., 10: 730 - 756, 1981.
- CONLEY, M.H. & COOPER, M.D. - Immature IgA B cells in IgA deficient patients. New Engl. J. Med., 305: 495-497, 1981.
- CONSTANTOPOULOS, A. ; NAJJAR, V. A. & SMITH, J. W. - Tuftsin deficiency: A new syndrome with defective phagocytosis. J.Pediatr., 80: 564-572, 1972.
- CONSTANTOPOULOS, A. ; VICTOR, A. ; NAJJAR, M.D. ; WISH, J.B. ; NECHELES, T.H. & STOLBACH, L.L. - Defective Phagocytosis due to tuftsin deficiency in splenectomized subjects. Am. J. Dis. Child., 125: 663-665, 1973.
- CORRY, J.M. ; POLHILL, R.B. JR. ; EDMONDS, S.R. & JOHNSTON, R. B. JR. - Activity of the alternative complement pathway after splenectomy: Comparison to activity in sickle cell disease and hypogammaglobulinemia. J. Pediatr., 95: 964-969, 1979.
- COSTA, F.F. - Síntese de Globinas na Heterozigose dupla para Beta-Talassemia e Hemoglobinopatia. Ribeirão Preto, - SP, 1981. (Tese de Doutorado - Universidade de São Paulo).

- COWAN, M. J. ; AMMANN, A. J. ; WARA, D. W. ; HOWIE, V. M. ;
SCHULTZ, L. ; DOYLE, N. ; KAPLAN, M. - Pneumococcal polysaccharide immunization in infants and children. *Pediatrics*, 62 : 721 - 727, 1978.
- CRAMER, E. B. ; MILKS, L. C. & OLAKIAN, G. R. - Transepithelial migration of human neutrophils an in vitro model system. *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash)*, 77: 4069 - 4073, 1980.
- DACIE, J. V. ; LEWIS, S. M. & WHITE, J. M. - Laboratory methods used in the investigation of the haemolytic anaemias. III. Hemoglobinopathies. In: DACIE, J. V. & LEWIS, S. M. (eds.) - Practical Haematology. Churchill Livingstone, Edinburg, London, New York, 5 th ed. , 1975. p. 236-254.
- DAIKOS, G. & WEINSTEIN, L. - Streptococcal bacteriostatic antibody in patients treated with penicillin. *Pro. Soc. Exp. Biol. Med.*, 78: 160 163, 1951.
- DAVIS, C. A. ; VALLATA, E. H. & FORRISTAL, J. - Serum complement levels in infancy : Age related changes. *Pediat. Res.*, 13: 1043 - 1046, 1979.

DEAN, J. & SCHECHTER, A. N. - Sick cell anemia: Molecular and cellular bases of therapeutic approaches. N. England. J. Med., 299: 752-763, 1978.

DE CEULAER, K. ; WILSON, W. A. ; MORGAN, A. G. & SERJEANT, G. R. - Haemoglobinaemia and activation of the complement system in homozygous sick cell disease. J. Clin. Lab. Immunol., 6: 57 - 60, 1981.

DE TORREGROSA, M. V. ; DAPENA, R. B. ; HERNANDEZ, A. & ORTIZ, A. - Association of Salmonella caused osteomyelitis and sick cell disease. JAMA, 174: 354-356, 1960.

DICH, V. Q. ; NELSON, J. D. & HALTALIN, K. C. - Osteomyelitis in infants and children: A review of 163 cases. Am. J. Dis. Child., 129: 1273-1278, 1975.

DIGGS, L. W. - Bone and Joint lesions in sick cell disease. Clin. Orthop. Related Res., 52: 119-143, 1967.

DIGGS, L. W. - Anatomic lesions in sick cell disease in Abramson H. Bertles J. F. & Wethers, D. L. (ed.) Sick cell disease. Diagnosis, management education and research. St. Louis, 1973. p. 189-229.

- DIMITROV, N. V. ; DOUWES, F. R. ; BARTOLOTTA, B. ; NOCHUMSON, S. & TOTH, M. A. - Metabolic activity of polymorphonuclear leukocytes in sickle cell anemia. *Acta Haematol.*, 47: 283-291, 1972.
- DONADI, E. A. ; FALCÃO, R. P. & BOTTURA, C. - Medida da migração de neutrófilos de pacientes com doença falciforme. *Anais do IX Congresso do Colégio Brasileiro de Hematologia*, 1983.
- DUBOIS, M. ; GILLES, K. A. ; HAMILTON, J. K. ; RIBEIRO, P. A. & SMITH, F. - Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Anal. Chem.*, 28: 350, 1956.
- EHRENPREIS, B. & SCHWINGER, H. N. - Sickle cell anemia. *Am. J. Roentgen*, 68: 28-36, 1952.
- ENGH, C. A. ; HUGHES, J. L. ; ABRAMS, R. C. & BOWERMAN, J. W. - Osteomyelitis in the patient with sickle cell disease. *J. Bone and Joint Surg.*, 53: 1-15, 1971.
- EVANS, H. E. & REINDORF, C. - Serum immunoglobulin levels in sickle cell disease and Thalassemia major. *Am. J. Dis. Child.*, 116: 586-590, 1968.
- FALCÃO, R. P. ; VOLTARELLI, J. C. ; BOTTURA, C. - The possible role of the spleen in the reduction of nitroblue tetrazolium by neutrophils. *Acta Haem.*, 42: 2-9, 1981.

FIELD, R. J. ; OVERTURF, G. D. & STRUNK, R. - Opsonization of Salmonella enteritidis lipopolysaccharide in sickle cell disease .
Pediatr. Res., 15: 107-111, 1981.

FINCH, C. A. - Pathophysiologic aspects of sickle cell anemia. Am.
J. Med., 53: 1-6, 1972.

FINLAND, M. ; SHUMAN, I. - The type-specific agglutinin response
of infants and children with pneumococcal pneumonias. J. Immunol., 45: 215-222, 1942.

FULGINITI, V. A. & SIEBER, O. F. JR. - Immune mechanisms in Infections diseases. In: STIEHM, E. R. & _____ (eds). Immunologic disorders in infants and children. 2nd ed. Philadelphia, W. B. Saunders, 1980. p. 687-714.

FULGINITI, V. A. - Active and passive immunization in the prevention of infectious diseases. In: STIEHM, E. R. & _____ (eds). Immunologic disorders in infants and children 2nd ed. Philadelphia, W. B. Saunders, 1980. p. 660-686.

FULGINITI, V. A. - Immunization: Theory and practice. In: Wedgwood R. J. ; DAVIS, S. D. ; RAY, C. G. & KELLEY, V. C. ; (eds). Infections in children 1st ed. Harper & Row, Publishers Philadelphia, 1982, p. 14-53.

GALLIN, J. I. ; GALLIN, E. K. ; MALECH, H. L. & CRAMER, E. B. -

Structural and ionic events during leukocyte chemotaxis. In: _____
_____ & QUIE, P. G. (eds.) Leukocyte chemotaxis. New York,
Raven Press, 1978. p. 123-141.

GAVRILIS, P. ; ROTHEMBERG, S. P. & GUY, R. - Correlation of low se
rum IgM levels with absence of functional splenic tissue in si
ckle cell disease syndromes. Am. J. Med., 57: 542-545, 1974.

GIVNER, L. B. & LUDDY, R. E. & SCHWARTZ, E. D. - Etiology of osteo
myelitis in patients with major sickle hemoglobinopathies. J .
Pediatr., 99: 411 - 413, 1981.

GOLD, R. ; LEPOW, M. L. ; GOLDSCHNEIDER, I. ; DRAPER, T. F. & GOTS
CHLICH, E. C. - Clinical evaluation of group A and group C me
ningococcal polysaccharide vaccines in infants. J. Clin. Invest.,
56: 1536 - 1547, 1976.

GOLDE, D. W. - Disorders of mononuclear phagocyte proliferation ma
turation, and function. Clin. Haematol., 4: 705-721, 1975.

- GOLDING, J. S. R.; MAC IVER, J. E. & WENT, L. H. - The bone changes in sickle cell anemia and its genetics variants. J. Bone Joints Surg., 41-B: 711-718, 1959.
- GRIFFIN, F. M. ; GRIFFIN, J. A. ; LEIDER J. E & SILVERSTEIN, S. C. - Studies on the mechanism of phagocytosis. I- Requirements for circumferential attachment of particle - bound ligands to specific receptores on the macrophage plasma membrane. J. Exp. Med., 142: 1263-1281, 1975.
- GRIFFIN, F. M. ; GRIFFIN, J. A. & SILVERSTEIN, S. C. - Studies on the mechanism of phagocytosis - II - The interaction of macrophages with anti-immunoglobulin IgG coated bone marrow - derived lymphocytes. J. Exp. Med., 144: 788-809, 1976.
- GRIFFIN, J. A. & GRIFFIN JR, F. M. - Augmentation of macrophage complement receptor function in vitro I - Characterization of the cellular interactions required for the generation of a T lymphocyte product which enhances macrophage complement receptor function. J. Exp. Med., 150: 653-675, 1979.
- GRIFFIN, F. M. JR. & GRIFFIN, J. A. - Augmentation of macrophage complement receptor function in vitro II - Characterization of the effects of a unique lymphokine upon the phagocytic capabilities of macrophages. J. Immunol., 125: 844-849, 1980.

GRIFFIN, F. M. JR. & MULLINAX, P. J. - Augmentation of macrophage complement receptor function in vitro III - C3b receptors that promote phagocytosis migrate within the plane of the macrophage plasma membrane. J. Exp. Med., 154: 291-305, 1981.

GRIFFIN, F. M. JR. & MULLINAX, P. J. - Augmentation of Macrophage complement receptor function in vitro. IV - The lymphokine that activates macrophage C3 receptors for phagocytosis binds to a fucose - bearing glycoprotein on the macrophage plasma membrane. J. Exp. Med., 160: 1206-1218, 1984.

HANCOCK, W. W. ; ZOLA, H. & ATKINS, R. C. - Antigenic heterogeneity of human mononuclear phagocytes: Immunohistologic analysis using monoclonal antibodies. Blood. 62: 1271-1279, 1983.

HAND, W. C. & KING, N. L. - Serum opsonization of Salmonella in sickle cell anemia. Am. J. Med., 64: 388-395, 1978.

HAYWARD, A. R. - Development of lymphocyte responses and interactions in the human fetus and newborn. Immun. Rev., 57: 39-60, 1981 a.

HAYWARD, A. R. - Development and maturation of immunity in the newborn. In: LAMBERT, H. P. & WOOD, C. B. S., (eds). Immunological aspects of infection in the fetus and newborn. London, Academic Press, 1981 b. p. 107-122.

HAYWARD, A. R. - Development of Immunity Mechanisms. In: SOOTHILL, J. F. ; HAYWARD, A. R. & WOOD, C. B. S. ,(eds.) Paediatric Immunology. Oxford, Blackwell Scientific Publications. 1983. p. 48-55.

HENDERSON, A. B. - Sick cell anemia: Clinical study of fifty - four cases. Am. J. Med., 9: 757-765, 1950.

HENDRICKS, J. ; DE CEULAER, K. ; WILLIAMS, E. & SERJEANT, G. R. - Mononuclear cells in sick cell disease; subpopulations and in vitro response to mitogens. J. Clin. Lab. Immunol., 13: 129 - 132, 1984.

HENDRICKSE, R. G. & COLLARD, P. - Salmonella osteitis in nigerian children. Lancet. I : 80-82, 1960.

HERNANDEZ, P. ; CRUZ, C. ; SANTOS, M. N. & BALLESTER, J. M. - Immunologic dysfunction in sick cell anaemia. Acta Haemat., 63 : 156-161, 1980.

HERNANDEZ, D. E. ; GONZALEZ, N. ; RICO, R. ; MERCHAN, L. & WUANT, H. - Phagocytosis in patients with sick cell disease. J. Clin. Lab. Immunol., 12: 137-140, 1983.

HIGGS, D. R. ; ALDRIDGE, B. E. ; LAMB, J. ; CLEGG, J. B. ; WEATHERALL, D. J. ; HAYES, R. J. ; GRANDISON, Y. ; LOWRIE, Y. ; MASON, K. P. ; SERJEANT, B. E. & SERJEANT, G. R. - The interaction of alpha-thalassemia and homozygous sickle cell disease. New Engl. J. Med., 306: 1441-1446, 1982.

HODGES, F. & HOLT, J. F. - Editorial comment. In: Hodges, F. J. (ed) The 1951 year book of radiology (June 1950-june 1951). Chicago: year Book Publishers, Inc., 1951. p. 394-395.

HOLROYDE, C. P. ; OSKI, F. A. & GARDNER, F. H. -The "pocked" erythrocyte. Red cell surface alterations in reticuloendothelial immaturity of the neonate. New Engl. J. Med., 281: 516-520, 1969.

HOOK, E. W. ; CAMPBELL, L. G. & WEENS, H. S. - Salmonella osteomyelitis in patients with sickle cell anemia. N.Engl. J. Med., 257: 403-407, 1957.

HOOK, E. W. - Salmonellosis: certain factors influencing the interaction of Salmonella and the human host. Bull. N.Y. Acad. Med., 37: 499-512, 1961.

HUDSON, L. & HAY, F. C. - Antibody effector systems. In: Practical Immunology 2nd ed. Oxford, Blackwell Scientific Publications. 1983. p. 142-155.

HUGHES, J. G. & CARROLL, D. S. - Salmonella osteomyelitis complicating sickle cell disease. Pediatrics., 19: 184-185, 1957.

HUEHNS, E. R. ; DAVIES, S. C. & BROZOVIC, M. - Fresh Frozen plasma for vaso-occlusive crises in sickle cell disease. Lancet, 1 : 1310-1311, 1981.

HUISMAN, T. H. J. - Sickle cell anemia as a syndrome: A review of diagnostic features. Am. J. Haematol., 6: 173-184, 1979.

INABA, K. ; MASUDA, T. ; MIYAMA-INABA, M. ; AUTSUKA, Y. ; FURA, F; KOMATSU-BARA, S. ; IDO, M. & MURAMATSU, S. - Ontogeny of macrophage function. III Manifestation of high accessory cell activity for primary antibody response by Ia⁺ functional cells in newborn mouse spleen in collaboration with Ia⁻ macrophages. Immunology, 47: 449-457, 1982.

INGRAM, V. M. - Gene mutation in human haemoglobin: The chemical differences between normal sickle cell haemoglobin. Nature, 180: 326-328, 1957.

ISICHEI, V. P. - Serum protein profile in sickle cell disease. J. Clin. Pathol., 32: 117-121, 1979.

JENSEN, J. A. ; ESQUENAZE, V. & CIANCIOLO, G. - Antigen - dependent chemotaxis. In: GALLIN , J. I. & QUIE, P. Q. , eds. Leukocyte Chemotaxis. New York, Raven Press, 1978. p. 255-266.

JOHNSTON, R. B. JR. ; NEWMAN, S. L. & STRUTH, A. G. - An abnormality of the alternative pathway of complement activation in sickle cell disease. N. Engl. J. Med., 288: 803-808, 1973.

JOHNSTON, R. B. ; KEELE, B. B. ; MISRA, H. P. ; LEHMEYER, J. E. ; WEBL, L. S. ; BAEHNER, R. L. & RAJAGOPALAN, K. V. - The role of superoxide anion generation in phagocytic bactericidal activity. J.Clin. Invest., 55: 1357-1372, 1975.

KABINS, S. A. & LERNER, C. - Fulminant pneumococcaemia and sickle cell anaemia. JAMA., 211: 467-471, 1970.

KAYDEN, H. J. & BESSIS, M. - Morphology of normal erythrocyte and acanthocyte using nomarski optics and the scanning electron microscope. Blood, 35: 427-436, 1970.

KAYE, D. ; GILL, F. A. & HOOK, E. W. - Factors influencing host resistance to Salmonella infections: The effect of haemolysis and erithrophagocytosis. Am. J. Med. Sci., 254: 205- 209 . 1967.

KELLER, R. - Characteristics of cytotoxic macrophages as natural effectors of resistance to cancer. Clin. Immunol. Allergy, 3 : 523-537, 1983.

KLEIN, J. O. -The epidemiology of pneumococcal disease in infants and children. Rev. Infect. Dis., 3: 246-253, 1981.

KLEIN, J. - Cells of the immune system. In: _____.
Immunology: The Science of self non self discrimination. New York. John Wiley & Sons, 1982 a. p. 92-155.

KLEIN, J. - Complement and other activation systems. In: _____.
Immunology: The Science of self non self discrimination. New York, John Wiley & Sons, 1982 b. p. 310-346.

KLEIN, J. - Immune responses dominated by cells of the monocytic series. In: _____: Immunology: The Science of self non self discrimination. New York . John Wiley & Sons , 1982 c. p. 417-444.

KIM, H. C. - Variants of sickle disease . . . In: SCHWARTZ, E. (ed): Hemoglobinopathies in children, PSG. Publishing Company, Littleton Massachusetts, 1980. p. 215-248.

KIM, H. C. ; FRIEDMAN, S. ; ASAKURA, T. & SCHWARTZ, E. -Inclusions in Red blood cells containing HbS or HbC. Brit. J. Haematol., 44: 547-554, 1980.

KIM, H. C. ; WEIERBACH, R. G. ; FRIEDMAN, S. & SCHWARTZ, E. - Globin biosynthesis in sickle cell. Hb SC and HbC disease . Pediatrics, 91: 13-18, 1977.

- KITCHENS, C. S. - Immunologic aspects of the spleen. In: WALDMAN , R. H. ed. Clinical concepts of immunology. Baltimore, William & Wilkins, 1979. p. 201-203.
- KOETHE, S. M. ; CASPER, J. T. & RODEY, G. E. - Alternative complement pathway activity in sera from patients with sickle cell disease. Clin. Exp. Immunol., 23: 56-60, 1976.
- KONOTEY-AHULU, F. I. D. - Computer assisted analysis of data on 1697 patients attending the sickle cell/haemoglobinopathy clinic of Korle Bu Teaching Hospital, Accra, Ghana: Clinical features : Sex, genotype, age, rheumatism and dactylitis frequencies. Ghana Med. J., 10: 241-260, 1971.
- KONOTHEY - AHULU, F. I. D. - The sickle cell disease: Clinical manifestations including the "sickle crisis". Arch. Intern. Med., 133: 611-619, 1974.
- LARCHER, V. F. ; WYKE, R. J. ; DAVIS, L. R. ; STROUD, C. E. & WILLIAM, R. - Defective yeast opsonization functional deficiency of complement in sickle cell disease. Arch. Dis. Child., 57 : 343-346, 1982.
- LAZZARI, A. A. - Inibição da fagocitose via Fc em monocitos humanos pelo soro de portadores de Doença Reumatoide clássica. São Paulo, 1980. (Dissertação de Mestrado - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo).

LEEDOM, J. M. - Pneumococcal infections. In: WEDGWOOD, R. J. ; DAVIS, S. D. ; RAY, C. G. & KELLEY, V. C. ;(eds). Infections in children 1st ed. Harper & Row, Publishers Philadelphia, 1982 , p. 593-625.

LEHMAN, H. & HUNTSMAN, R. G. - Man's Haemoglobins . Amsterdam : North Holland, 1966.

LEHMAN, H. & HUNTSMAN, R. G. - Man's Haemoglobins, 2nd ed., Philadelphia, J. B. Lippincot Co., 1974.

LIKHITE, V. V. - Immunological impairment and susceptibility to infection after Splenectomy. JAMA, 236: 1376-1377, 1977.

LOBEL, J. S. & BOVE, K. E. - Clinicopathologic characteristics of septicemia in sickle cell disease. Am. J. Dis. Child., 136: 543-547, 1982.

LOWRY, O. H. ; ROSENBOUGH, N. J. ; FARR, A. L. & RANDAL, R. J. - Protein measurement with the pholin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193: 265, 1951.

LU, C. Y. ; CALAMAI, E. G. ; UNANUE, E. R. -A defect in the antigen-presenting function of macrophages from neonatal mice. Nature, 282: 327-329, 1979.

LUKENS, J. N. ; GASTON, M. H. ; CHILCOTE, R. P. ; PEARSON, H. A. & ROSSE, W. F. - Pediatric hematology : Sick cell anemia.

LUO, N. K. & ROWLAND, H. A. K. - The bactericidal and opsonic effects of serum from patients with sick cell anaemia Bull. Soc. Path. Exp., 76: 657-667, 1983.

MAHONEY, D. H. & FERNBACH, D. J. - Monocyte functions in sick cell disorders. American J. Pediatric Hematol/Oncol., 5: 409-411. 1983.

MÄKELÄ, P. H. ; SIBAKOV, M. ; LEINONEN, M. ; KOSKELA, M. ; PUKANDER, J. ; PÖNTYNEN, S. ; GRÖNROOS, P. & KARMA, P. - Pneumococcal vaccine and otitis media. Lancet. 2 : 547-551, 1980.

MANN, J. R. - Sick cell haemoglobinopathies in England. Arch. Dis. Child., 56: 676-683, 1981.

MASUDA, A. - Avaliação do sistema fagocitário mononuclear na hanseníase. São Paulo, 1977. (Tese de Doutorado Escola Paulista de Medicina).

MC INTOSH, S. ; ROOKS, Y. ; RITCHEY, A. K. & PEARSON, H. A. -Fever in young children with sick cell disease. J. Pediatr., 96: 199-204, 1980.

- MILLARD, D. ; DE CEULAER, K. ; VAIDYA, S. & SERJEANT, G. R. - Serum immunoglobulin levels in children with homozygous sickle cell disease. Clin. Chim. Acta., 125: 81-87, 1982.
- MILLER, M. E. - The immunodeficiencies of immaturity .In: STIEHM, E. R. & FULGINI, T. V. A. , eds. - Immunologic disorders in infants and children. 2 nd. ed. Philadelphia, W. B. Saunders, 1980, p. 219-238.
- MILNER, P. F. - The sickling disorders. Clin. Haematol, 3: 289 - 336, 1974.
- MYIAWAKI, T. ; MORITA, N. ; NAGAOKI, T. & TANIGUCHI, B. - Maturation of B-cell differentiation ability and T- cell regulatory function in infancy and childhood. Immun. Rev., 57: 61-87, 1981.
- NAJJAR, V. A. - Defective phagocytosis due to deficiencies involving the tetrapeptide, tuftsin. J. Pediatr., 87: 1121-1124 , 1975.
- NAJJAR, V. A. - Molecular basis of familial and acquired phagocytosis deficiency involving the tetrapeptide thre-Lys-Pro-Arg-tuftsin. Exp. Cell. Biol., 46: 114-126, 1978.
- NASPITZ, C. K. ; SOLÉ, D. ; CARNEIRO-SAMPAIO, M. M. S. & GONZALEZ, C. H. - Níveis séricos de IgG, IgM e IgA de crianças brasileiras normais. J. Pediatr., 62: 121-126, 1982.

NORDEN, C. W. ; MELISH, M. ; OVERALL, J. C. JR. ; BAUM, J. - Immunologic responses to Haemophilus influenzae meningitis. J. Pediatr., 80: 209-214, 1972.

O'BRIEN, R. T. ; MC. INTOSH, S. ; ASPNES, G. T. & PEARSON, H. A. - Prospective study of sickle cell anemia in infancy. J. Pediatr., 89: 205-210, 1976.

OCHS, H. D. & WEDGWOOD, R.J. - Disorders of the B-cell system. In: STIEHM, E. R. & FULGINITI, V. A. (eds). Immunologic disorders in infants and children 2nd ed. Philadelphia, W. B. Saunders, 1980 p. 239-259.

OLIVEIRA LIMA, A. & DIAS DA SILVA, W. - Apêndice. In: _____ (eds). Immunologia, imunopatologia, Alergia-métodos. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro. 1970. p. 617.

ONWUBALILI, J. K. - Sickle cell disease and infection (special review) J. Infection, 7: 2-20, 1984.

OPPENHEIMER, E. H. & ESTERLY, J. R. - Pulmonary changes in sickle cell disease. Am. Rev. Respir. Dis., 103: 858-859, 1971.

OVERTURE, G. D. ; POWARS, D. & BARAFF, L. J. - Bacterial meningitis and septicemia in sickle cell disease. Am. J. Dis. Child., 131: 784 - 787, 1977.

OXELIUS, V. A. - Chronic infections in a family with hereditary deficiency of IgG₂ and IgG₄. Clin. Exp. Immunol., 17: 19 - 22, 1974.

OXELIUS, V. A. - IgG subclass levels in infancy and childhood Acta Paediat. Scand., 68: 23 - 27, 1979.

PABST, H. F. & KRETH, H. W. - Ontogeny of the immune response as a basis of childhood disease. J. Pediat., 97: 519-534, 1980.

PAULING, L.; ITANO, H. A.; SINGER, S. J. & WELLS, T. C. - Sickle cell anemia. A molecular disease. Science, 110: 543-548, 1949.

PEARSON, H. A.; CORNELIUS, E. A.; SCHWARTZ, A. D.; ZELSON, J. H.; WOLFSON, S. L. & SPENCER, R. P. - Transfusion reversible functional asplenia in young children with sickle cell anemia. N. Engl. J. Med., 283: 334 - 337, 1970.

PEARSON, H. A.; MCINTOSH, S.; RITCHEY, A. K.; LOBEL, J. S.; ROOKS, Y. & JOHNSTON, D. - Developmental aspects of splenic function in sickle cell disease. Blood, 53: 358 - 365, 1979.

PEARSON, H. A.; SPENCER, R. P. & CORNELIUS, E. A. - Functional asplenia in sickle cell anemia. N. Engl. J. Med., 281: 923-926, 1969.

PEMBREY, M. E.; MAC WADE, P. & WEATHERALL, D. J. - Reliable routine estimation of small amounts of foetal haemoglobin by alkali denaturation. J. Clin. Path., 25: 738 - 740, 1972.

PETCH, M. C. & SERJEANT, G. R. - Clinical features of pulmonary lesions in sickle cell anemia. Br. Med. J., iii: 31-32, 1970.

PELTOLA, H.; MÄKELÄ, H.; KÄYHTY, H.; JOUSIMIES, H.; HERVA, E.; HÄLLSTRÖM, K.; SIVONEN, A.; RENKONEN, O. V.; PETTAY, O.; KARANKO, V.; AHVONEN, P. & SARNA, S. - Clinical efficacy of meningococcus group A capsular polysaccharide vaccine in children three months to five years of age. N. Engl. J. Med., 297: 686 - 691, 1977.

PILLEMER, L.; BLUM, L.; LEPOW, I. H.; WURTZ, L. & TODD, E. W. - The properdin system and immunity. III The zymosan assay of properdin. J. Exp. Med., 103: 1, 1956.

PORTER, T. & THURMAN, W. G. - Studies of sickle cell disease diagnosis in infancy. Am. J. Dis. Child., 106: 35-40, 1963.

POWARS, D. R. - Natural history of sickle cell disease. The first ten years. Semin. Hematol., 12: 267-285, 1975.

POWARS, D. ; OVERTURF, G. D. & WILKINS, J. - Commentary: Infections in sickle cell and SC disease . J. Pediatr., 103: 242-244, 1983.

POWARS, D. R. ; WEISS, J. N. ; CHAN, L. S. & SCROEDER, W. A. - Is there a threshold level of fetal hemoglobin that ameliorates morbiditis in sickle cell anemia? Blood, 63: 921 - 926, 1984.

PROBER, C. G. ; FRAYHA, H. ; KLEIN, M. & SCHIFFMAN, G. - Immunologic responses of children to serious infections with Streptococcus pneumoniae . J. Infect. Dis., 148: 427-435, 1983.

PROVISOR, A. J. ; ALLEN, J. M. & BAEHNER, R. L. - Utilization of a functional phagocytic assay system in the evalation of opsonic activity in sera from patients with sickle cell anemia. Pediatr. Res., 10: 380, 1976.

PROVISOR, A. J. & BAEHNER, R. L. - Bacterial Infection in sickling disorders. In- E. Schwartz (ed.) : Hemoglobinopathies in children. PSG Publishing Company, Littleton Massachussets, 1980 p. 249 - 261.

QUIE, P. G. & MILLS, E. L. - Bactericidal and metabolic function of polymorphonuclear leukocytes. Pediatrics, 64: 719 - 721. (Suppl), 1979.

RAMALHO, S. - As hemoglobinopatias hereditárias de importância médica no Brasil (Monografia), 1983.

RIVER, G. L.; ROBBINS, A. B. & SCHWARTZ, S. O. - SC hemoglobin: A clinical study. Blood, 18: 385-415, 1961.

ROBBINS, J. B & PEARSON, H. A. - Normal response of sickle cell anemia patients to immunization with Salmonella vaccines, J. Pediatr., 66: 877-882, 1965.

ROBINSON, M. G. & HALPERN, C. - Infections, Escherichia coli, and sickle cell anemia. JAMA, 230: 1145-1148, 1974.

ROBINSON, M. G. & WATSON, R. J. - Pneumococcal meningites in sickle cell anemia. N. Engl. J. Med., 274: 1006-1008, 1966.

ROGERS, D. W.; SERJEANT, B. E. & SERJEANT, G. R. - Early rise in "pitted" red cell count as a guide to susceptibility to infection in childhood sickle cell anaemia. Arch. Dis. Child., 57 : 338-342, 1982.

ROSEN, F. S. & ALPER, C. A. - Disorders of the complement system. In: STIEHM, E. R. & FULGINITI, V. A., (eds) - Immunologic Disorders in Infants and children. 2nd ed. Philadelphia, W. B. Saunders, 1980. p. 385-398.

ROSENTHAL, A. S.; THOMAS, J. W.; SCHROER, J. & BLAKE, T. - The role of macrophages in genetic control of the immune response. In FOUGEREAU, M. & DAUSSET, J., (eds). Fourth International Congress of Immunology 80. Progress in Immunology IV. Academic Press, 1980. p. 458-477.

ROWLEY, D. A. - The formation of circulating antibody in the sple_nectomized, human being following intravenous injection of heterologous erythrocytes. J. Immunol., 65: 515 , 1950.

RUSSEL, S. W. - Autoregulation of mononuclear Phagocyte function. Adv. Exp. Med. Biol., 155: 507-517, 1982.

SAPHRA, T. & WINTER, J. W. - Clinical manifestations of Salmonellosis in man: Evaluation of 7779 human infections identified at New York Salmonella Center. N. Engl. J. Med., 256: 1128 - 1134, 1957.

SCHULKIND, M. L.; ELLIS, E. F. & SMITH, R. T. - Effect of antibody upon clearance of I¹²⁵ labelled pneumococci by the spleen and liver. Pediatr. Res., 1: 178-184, 1967.

SCHWARTZ, A. D. & PEARSON, H. A. - Impaired antibody response to intravenous immunization in sickle cell anemia. Pediatr. Res., 6: 145-149, 1972.

SCOTT, R. B.; FERGUSON, A. D.; JENKINS, M.E., & CLARK, H. M. - Studies in sickle cell anemia. VIII. Further observations on the clinical manifestations of sickle cell anemia in children. Am. J. Dis. Child., 90: 682-691, 1955.

SEELER, R. A - Deaths in children with sickle cell anemia. A clinical analysis of 19 fatal instances in Chicago. Clin. Pediatr. (Phila), II: 634-637, 1972.

SEELER, R. A. & JACOBS, N. M. - Pyogenic infection in children with sickle hemoglobinopathy (letter). J. Pediatr., 90: 161-162, 1977.

SEELER, R. A.; METZGER, W. & MUFSON, M. A. - Diplococcus pneumoniae infections in children with sickle cell anemia. Am. J. Dis. Child., 123: 8-10, 1972.

SEGALL, A. W.; & SOOTHILL, J. F. - Phagocytes, In: SOOTHILL, J.F.; HAYWARD, A. R. & WOOD, C. B. S., eds. Pediatric Immunology. London Blackwell Scientific Publication, 1983. p. 37-47.

SEIDENSTEIN, H. - Salmonella osteomyelitis. Bull. Hosp. Joint. Dis., 6: 126-132, 1945.

SEITANIDIS, B.; MIHAS, A. & ANGELOPOULOS, B. - Serum Immunoglobulin levels in white patients with sickle cell disease. Clin. Chim. Acta., 37: 531-532. 1972.

SENNARA, H. & GORRY, F. - Orthopedic aspects of sickle cell anemia and allied hemoglobinopathies. Clin. Orthop., 130: 154-157, 1978.

- SIBER, G. R. ; SCHUR, P. H. ; AISENBERG, A. C. ; WEITZMAN, S. A. ;
SCHIFFMAN, G. - Correlation between serum IgG₂ concentrations
and the antibody response to bacterial polysaccharide antigens.
N. Engl. J. Med., 303: 178 - 182, 1980.
- SILLS, R. H. & OSKI, F. A. - RBC surface pits in sickle cell hemo-
globinopathies. Am. J. Dis. Child, 133: 526-527, 1979.
- SILVERSTRONI, E. & BIANCO, I. - Microdrepanocitoanemia in un sagge
to di razza bianca. Blood. Med. Roma, 70: 347 , 1944.
- SMITH, W. S. - Sickle cell anemia and Salmonella osteomyelitis.
Ohio State Med. J., 49: 692 - 695, 1953.
- SNEDECOR, G. W. & COCHRAN, W. G. - Statistical Methods, 6th. ed.
Ames, Iowa: Iowa State College press, 1967.
- SNYDERMAN, R. & GOETZL, E. J. - Molecular and cellular mechanisms
of leukocyte chemotaxis. Science, 213: 830 - 837, 1981.

SPIRER, ZVI; WEISMAN, Y.; ZARUTH, V.; FRIDKIN, M. & BOGAIR, N. -
Decreased serum tuftsin concentrations in sickle cell disease
Arch. Dis. Child, 55: 566-567, 1980.

STEIGBIGEL, R. T.; LAMBERT, L. H. & REMINGTON, J. S.; Phagocytic
and bactericidal properties of normal human monocytes. J. Clin.
Invest., 53: 131-142, 1974.

STEINBERG, E.; OVERTURF, G. D.; PORTNOY, B.; POWARS, D. R.; BOYER,
K. M. & CHERRY, J. D. - Serologic and clinical response of
children with sickle cell disease to bivalent influenza A split
virus vaccine J. Pediatr., 92: 823-825, 1978.

STIEHM, E. R. & FUDENBERG, H. H. - Serum levels of immune globu -
lins in health and disease: a survey. Pediatrics., 37: 715 -
719, 1966.

STIEHM, E. R.; SZTEIN, M.B.; STEEG, P. S.; MANN, D.; NEWLAND, C.;
BLAESE, M. & OPPENHEIM, J. J. - Deficient Dr Antigen expression
on human cord blood monocytes: reversal with lymphokines Clin.
Immunopath., 30: 430-436. 1984.

STOSSEL, T. P. - Phagocytosis. New Engl. J. Med., 290: 717-722, 1974.

STOSSEL, T. P. - Phagocytosis. Clinical disorders of recognition
and ingestion. Am. J. Pathol., 88: 741-751, 1977.

STOSSEL, T. P. - The mechanism of leukocyte locomotion. In: GALLIN, J. I. & QUIE, P. G., eds. Leukocyte chemotaxis: Methods physiology, and Clinical implications. New York, Raven Press, 1978 p. 143-160.

STRAUSS, R. G.; ASBROCK, T.; FORRISTAL, J. & WEST, C. D.;- Alternative pathway of complement in sickle cell disease. Pediatr.Res., 11: 285-289, 1977.

STRAUSS, R. G.; JOHNSTON, R. B.; ASBROCK, T. & WEST, C. D. - Neutrophil oxidative metabolism in sickle cell disease. J.Pediatr., 89: 391-394, 1976.

TERRITO, M. C. & CLINE, M. J. - Monocyte function in man. J. Immunol., 118: 1303-1309, 1976.

THORBURN, M. J. - The pathology of sickle cell anemia in Jamaican adults over 30. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 63: 102-111, 1969.

TODD, R. F. & SCHLOSSMAN, S. F. - Antigenic markers on human monocytes and macrophages. Adv. Exp. Med. Biol., 155: 409-421, 1982.

TONDO, C. V. & SALZANO, F. M. - Hemoglobin types of the caingang indians of Brazil. Sci., 132: 1983-1984, 1960.

TONDO, C. V. & SALZANO, F. M. - Abnormal hemoglobins in a Brazilian Negro Population. Amer. J. Hum. Genet., 14: 401 - 409, 1962.

TOPLEY, J. M. ; CUPIDORE, L. ; VAIDYA, S. ; HAYES, R. J. & SERJEANT, G. R. - Pneumococcal and other infections in children with sickle cell hemoglobin C (SC) disease. J. Pediatr., 101 : 176 - 179, 1982.

TURNER, S. R. & LYNN, W. S. - Lipid molecules as chemotactic factors. In: GALLIN, J. T. & QUIE, P. G. , eds. Leukocyte chemotaxis. New York, Raven Press, 1978. p. 289 - 298.

TWEARDY, D. J. ; BAILEY, J. E. ; SCHACTER, B. Z. & ELLNER, J. J. - Decreased surface expression of HLA-DR on human neonatal cord blood monocytes. Clin. Res., 30: 359a (abs), 1981.

UCLA - Conference - Mononuclear phagocytes: Immunological functions and disease implications. West. J. Med., 130: 153 - 157 , 1979.

VAN FURTH, R. ; VAN-ZWET, T. L. ; LEIJH, P. C. J. - In vitro determinations of phagocytosis and intracellular killing, by polymorphonuclear and mononuclear phagocytes. In: WEIR, D. M. , (ed.) Handbook of experimental immunology. 3rd. ed. Oxford Black Well Scientific Publications, 1978. p. 32.

- WAJIMA, T. - Nitroblue tetrazolium test in patients with sickle cell anemia. Am. J. Clin. Pathol., 64: 608-612, 1975.
- WARD, J. & SMITH, A. - Hemophilus influenzae bacteremia in children with sickle cell disease. J. Ped., 88: 261-263, 1976.
- WEATHERALL, D. J. - Biochemical phenotypes of thalassemia in Cooley's anemia. Ann. N.Y. Acad. Sci., 119: 450, 1964.
- WEATHERALL, D. J. & CLEGG, J. B. - The thalassaemia syndrome. 2nd Ed., Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1972.
- WESTPHAL, O. - Antigens III Immunochemical fractionation of antigens. In: KWAPINSKI, J. B. (ed.). Methods of serological Research, John Willey & Sons, Inc. New York, London, Sydney, 1965, p. 59-64.
- WHERLE, P. F. ; MATHIES, A. W. ; LEEDON, J. M. & IVLER, D. - Bacterial meningitis. Ann Ny Acad. Sci., 145: 488-498, 1967.
- WILSON, W. A. ; HUGHES, G. R. V. & LACHMANN, P. J. - Deficiency of factor B of the complement system in sickle cell anaemia. Br. Med. J., 1: 367-369, 1976.
- WILSON, W. A. ; THOMAS, E. J. & SISSONS, J. G. P. - Activation of the complement system in asymptomatic patients with sickle cell anemia. Clin. Exp. Immunol., 36: 130-139, 1979.

- WINKELSTEIN, J. A. - Complement and Natural Immunity. Clin. Immunol. Allergy, 3: 431-439, 1983.
- WINKELSTEIN, J. A. & DRACHMAN, R. A. - Deficiency of pneumococcal serum opsonizing activity in sickle cell disease. New Engl. J. Med., 279: 459-466, 1968.
- WINKELSTEIN, J. A. ; SMITH, M. R. & SHIN, H. S. - The role of C3 as an opsonin in the early stages of infection. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 149: 397-401, 1975.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION - Hemoglobinopathies and allied disorders. Tech. Resp. Ser. Wld. Hlth. Org., 338, 1966.
- YACHIE, A. ; MYIAWAKI, T. ; NAGAOKI, T. ; YOKOI, T. ; MUKAI, M. ; UWADANA, N. & TANIGUCHI, N. - Regulation of B cell differentiation by T cell subsets defined with monoclonal OKT₄ and OKT₈ antibodies in human cord blood. J. Immunol., 127: 1314-1317, 1981.
- YONEMASU, K. ; KITAJIMA, H. ; TANABE, S. ; OCHI, T. & SHINKAI, H. - Effect of age on C1q and C3 levels in human serum and their presence in colostrum. Immunology., 35: 523-528, 1978.
- ZAGO, M. A. & BOTTURA, C. - Splenic function in sickle cell diseases. Clin. Science, 65: 297-302, 1983.

- ZAGO, M. A. & COSTA, F. F. - Hereditary haemoglobin disorders in Brazil. Trans. Royal Soc. Trop. Hyg., 79. 1985.
- ZAGO, M. A. ; COSTA, F. F. & BOTTURA, C. - "Beta thalassemia in Brazil " . Braz. J. Med. Biol. Res., 383, 1981.
- ZAGO, M. A. ; COSTA, F. F. ; FREITAS, T. C. & BOTTURA, C. - Clinical hematological and genetic features sickle cell anaemia and sickle cell thalassemia in brazilian population. Clin. Genet., 18: 58-64, 1980.
- ZAGO, M. A. ; COSTA, F. F. ; ISMAEL, S. J. & BOTTURA, C. - Enfermedades drepanocíticas en una poblacion brasileña. Sangre, 28 : 191-198, 1983 a.
- ZAGO, M. A. ; COSTA, F. F. TONE, L. G. & BOTTURA, C. - Hereditary hemoglobin disorders in a Brazilian population. Hum. Hered., 33 : 125-129, 1983 b.
- ZEMBALA, M. - Tests for monocyte function in human disease. Clin. Immunol. Allergy, 1: 543-560, 1981.

VII - APÊNDICE

Quimiotaxia de polimorfonucleares de pacientes com doença fal
ciforme. Prova realizada na ausência (meio) e presença de soro
de paciente (sp) ou de soro normal (snl), previamente incubados com LPS.

Nº	ORDEM	IDADE	SEXO	snl	sp	meio
01	SS	5a	M	139,02	133,32	71,97
02	SS	6a	M	75,55	75,41	43,33
03	SS	6a	F	130,19	121,98	35,7
04	Sβ ^o	6a	F	131,02	110,12	46,27
06	Sβ ^o	6a	F	-	-	67,71
08	SS	13a	F	124,12	104,47	65,64
09	SS	11a	F	124,93	112,62	-
10	SS	1a3m	F	87,11	84,44	22,5
11	SS	13a	F	124,07	125,05	38,57
12	SS	1a9m	F	98,127	113,794	23,6
13	SS	3a	F	117,39	77,39	54,52
14	SS	6a	F	119,73	128,19	53,42
15	SS	5a	F	101,52	103,01	42,44
16	SS	5a9m	M	136,07	142,116	36,94
17	SS	5a	F	108,43	130,89	-
18	SS	11a	F	124,98	119,43	45,02
19	SS	4a	F	138,43	131,96	-
23	SS	11a	M	119,43	110,5	44,29
24	SS	7a	F	117,13	116,94	26,5
25	SS	4a	M	125,2	98,6	64,2
26	Sβ ^o	4a	F	96	117,54	26,6
27	SS	4a	M	116,15	106,72	-
28	Sβ ^o	11a	F	153,92	129,8	48,3
29	SS	7a	F	109,15	96,91	34,26
30	SC	9a	M	116	127,23	28,26
31	Sβ ^o	8a	M	118,33	120,09	73,85
32	SS	6a	F	117,58	123,1	22,3
33	SS	8a10m	F	127,17	108,05	52,61
34	SS	2a7m	M	108,45	115,63	44,88
35	SS	3a	F	117,86	118	19,22
36	SS	10a	M	126,55	122	50,06

Medidas em micra.

Total de pacientes estudados: 31. (SS = 25; S/β^o = 5; SC = 1).

Quimiotaxia de polimorfonucleares de indivíduos normais. Prova realizada na ausência (meio) e presença de soro de paciente ' (sp) ou de soro normal (snl), previamente incubados com LPS.

Nº ORDEM	IDADE	SEXO	snl	sp	meio
22	4a	M	133,13	*(20) -	-
23	3a	F	159,31	(22)159,48	55,33
24	11a	M	121,43	(24) -	-
25	9a	F	140,16	(27)128,52	25,62
26	11a	F	113,74	(23)108,28	54,44
27	4a	M	98,74	(25)117,99	38,85
28	7a	F	106,88	(09)130,27	33,05
29	4a	F	142,80	(24)114,31	28,31
30	5a	M	106,11	(30)112,50	36,20
31	5a	F	115,63	(31)121,13	38,50
32	3a	F	100	(19)109,89	47,65
33	5a	M	114,37	(35)111,96	39,59
34	8a	M	113,75	(26)110,67	43
35	6a	M	115,79	(32)100	44
36	6a	F	114,43	(33)137,55	36,9
37	9a	F	134,02	(34)135,45	52,3
48	9a	M	118,22	(14)107,92	31,03
50	8a	F	118,33	(36)113,12	41,29
51	3a6m	M	112,82	(07)121,78	25,95
64	2a3m	F	120	(15)111,91	25,8
65	9a	F	111,83	(18)122,04	27,28
67	10a	F	125,34	(08)124,6	48,62
68	13a	F	117,16	(29)123,6	46,027
70	9a9m	M	113,42	(17)121,20	39,21
78	7a6m	M	108,94	(13)119	44,05
79	1a9m	F	128,45	(10)111,80	46,27

Medidas em micra.

*() número de ordem do soro de paciente.

Total de indivíduos normais estudados: 26

Quimiotaxia de monócitos de pacientes com doença falciforme .
Prova realizada na ausência (meio) e presença de soro de pa-
ciente (sp) ou de soro normal (snl), previamente incubados com LPS.

Nº DE ORDEM		IDADE	SEXO	snl	sp	meio
01	SS	5a	M	103,36	109	36,25
02	SS	6a	M	-	92,37	25,4
06	S β^0	6a	F	111,58	110,44	27,4
08	SS	13a	F	85,05	83,69	35,15
12	SS	1a9m	F	96,347	87,476	17,09
14	SS	6a	F	106,47	119,40	36,89
18	SS	11a	F	110,21	115	29,65
20	SS	7a	M	79,74	82,64	19,9
21	S β^+	6a	F	66,26	69,74	26,63
22	S β^+	4a	M	78,22	88	40,35
23	SS	11a	M	106,43	93,53	60,4
24	SS	7a	F	64,57	52,83	31,63
25	SS	4a	M	93	95,8	19,25
26	S β^0	4a	F	108,07	104,07	26,5
28	S β^0	11a	F	109,69	103,90	26,57
29	SS	7a	F	113,15	116,27	27,33
32	SS	6a	F	83,63	87,19	12,29
33	SS	8a10m	F	109,6	118,55	40
34	SS	2a7m	M	115,72	109,69	29,18
35	SS	3a	F	103,95	99,54	24,90
36	SS	10a	M	111,25	112,76	32,25
37	SC	3a	F	94,52	103	34,45
38	SC	7a	F	120,21	123,21	25

Medidas em micra.

Total de pacientes estudados: 23 (SS= 16; S/ β^0 = 3; S/ β^+ = 2; SC=2)

Quimiotaxia de monócitos de indivíduos normais. Prova realizada na ausência (meio) e presença de soro de paciente (sp) ou de soro normal (sn1), previamente incubados com LPS.

Nº ORDEM	IDADE	SEXO	sn1	sp.	meio
41	3a6m	M	-	*(20)103,08	19,08
42	7a6m	M	-	(30)123,83	-
43	10a	F	108,21	(19)110,85	13,05
44	7a	M	74,52	(33) 66,82	11,22
45	9a	F	81,27	(23) 94,87	18,13
46	12a	M	112,81	(34)116,5	15,4
47	6a	M	105,84	(10) 96,65	15,1
58	7a	F	122,18	(32)116	34,95
59	4a	F	107,28	(35) 78,49	20,74
61	1a9m	F	104,81	(31) 88,23	18,6
62	10a	M	130,76	(06)125,5	29,62
66	4a	M	106,29	(16)117,33	24
69	9a2m	F	93,72	(18) 99,78	21,96
71	13a	M	96,76	(08)118,88	29,85
72	1a6m	F	95,77	(10)110,35	20,13
73	4a6m	F	93,25	(14) 97	23,52
12	7a	M	134,51	(10)132,62	36,32
13	4a	F	119,33	(08)108,27	26,65
14	4a	F	-	(15)104,2	23,93
15	11a	M	98,1	(17)104,62	35,25
16	9a	F	108,4	(14)114,3	29,25
17	6a6m	F	115,52	(18)110,35	39,80
18	5a6m	M	-	(13)111,65	39,35
19	3a8m	F	-	(16) 88,22	41,9
20	4a	F	118,4	(07) 94,6	31,55
21	6a	F	135,1	(08) -	-
35	6a	M	107,75	(20)118,28)	29,57
38	11a	M	118,65	(36)107,78	45
39	3a	F	75,94	(38) 67,23	26,15
40	13a	M	103,62	(25)113,94	50,62

Medidas em micra.

*() número de ordem do soro de paciente.

Total de indivíduos normais estudados: 30

Índex fagocitário de pacientes com doença falciforme. Prova realizada com eritrócitos de carneiro sensibilizados (EA) e partículas de zimosan incubadas ou não (ZNI) com soro de paciente (Zsp) ou soro normal (Zsnl).

Nº	ORDEM	IDADE	SEXO	EA	Zsnl	Zsp	Zni
01	SS	5a	M	79,12	79	82,02	6,14
02	SS	6a	M	26,86	68,28	50,45	22,10
03	SS	6a	F	69,15	77,72	86,30	-
04	Sβ ^o	6a	F	57,13	59,95	-	16,65
06	Sβ ^o	6a	F	-	60,25	72,79	-
07	SS	11	F	65,78	-	48,27	38,42
08	SS	13a	F	61,83	83,83	64,06	36,84
09	SS	11a	F	44,08	82,07	93,47	50,58
10	SS	1a3m	F	56,33	89,34	76,15	24,65
11	SS	13a	F	54,13	80	71,48	27,40
12	SS	1a9m	F	51,53	21,37	25,09	0,50
13	SS	3a	F	29,48	30,38	40,92	9,02
14	SS	6a	F	77,24	-	90,74	36
15	SS	5a	F	48,114	77,213	67,08	23,91
16	SS	5a9m	M	39,48	45,87	45	*2/446
17	SS	5a	F	30,34	14,09	13,27	1,69
18	SS	11a	F	67	77,8	63,46	-
19	SS	4a	F	8,69	62,45	66,06	-
20	SS	7a	M	70,41	82,81	67	26,95
21	Sβ ⁺	6a	F	58,99	47,87	56,42	16,37
22	Sβ ⁺	4a	M	59	-	-	2,54
23	SS	11a	M	42,18	49,41	48,41	16,6
24	SS	7a	F	51,85	53,27	43,21	-
25	SS	4a	M	20,64	38,21	30,35	5,46
26	Sβ ^o	4a	F	42,76	32,45	38,47	21,6
27	SS	4a	M	29,70	32,65	37,17	3,38
28	Sβ ^o	11a	F	40,73	53,73	58,06	17,19
29	SS	7a	F	25,426	64,31	64,98	15,06
30	SC	9a	M	28,156	98,80	80	54,5
31	Sβ ^o	8a	M	49,08	68,58	-	9,3
32	SS	6a	F	4,98	55,58	72,75	22,31
33	SS	8a10m	F	**2/300	79,55	82,37	34,91
34	SS	2a7m	M	43	77,65	79,86	11,48
35	SS	3a	F	17,21	84,34	69,36	11,95
36	SS	10a	M	31,66	82,88	73,6	2,19
37	SC	3a	F	18,25	62,81	66,22	14,28
38	SC	7a	F	49,22	80,96	62,58	10,94

Índex fagocitário: percentual de monócitos fagocitando.

* Em 446 células contadas apenas 2 fagocitaram

** Em 300 células contadas apenas 2 fagocitaram

Total de pacientes estudados: 37 (SS= 27; S/β^o= 5; S/β⁺= 2; SC= 3).

Índex fagocitário de monócitos de indivíduos normais. Prova realizada com eritrócitos de carneiro sensibilizados (EA) e partículas de zimosan incubadas ou não (ZNI) com soro de paciente (Zsp) ou soro normal (Zsnl).

Nº ORDEM	IDADE	SEXO	EA	Zsnl	Zsp	Zni
48	9a	M	54,92	93,73	*(14)89,74	28,78
49	5a	M	70,77	85,75	(10)86,01	11,11
50	8a	F	77,40	97,47	(36)92,88	29,78
51	3a6m	M	76,31	83,60	(07)85,35	11,69
52	2a8m	M	55,44	-	-	-
53	6a	M	67,88	90,34	(30)91,75	24,28
54	5a	M	80,65	91,96	(20)90,57	36,01
57	6a9m	F	77,27	91,92	-	-
58	7a	F	82,68	92,36	(32)88,86	32,21
59	4a	F	74,39	90,99	(35)77,63	-
60	11a	M	80,10	92,77	-	19,54
61	1a9m	F	40,14	84,06	(31)49,47	31,25
62	10a	M	76,74	-	(06)83,33	39,71
63	12a	M	63,28	85,89	(29)79,66	44,05
64	2a3m	F	65,26	90,19	(15)92,59	-
65	9a	F	72,0	-	(08)79,31	-
66	4a	M	87,40	86,18	(08)93,34	39,47
67	10a	F	95,73	96,56	(16)95,21	-
68	13a	F	79,96	-	(29)83,76	48,71
69	9a2m	F	86,80	84,47	(18)90,29	21,83
70	9a9m	M	78,70	67,48	(17)77,43	27,15
72	1a6m	F	74,28	75,26	(10)79,86	22,98
73	4a6m	F	85,78	86,75	(14)93,62	29,56
74	9a	M	82,56	96,86	(07)96,29	39,48
75	8a	M	84,10	94,86	(24)96,41	43,29
76	9a	M	83,36	93,18	(31)91,72	36,71
77	6a3m	F	77,94	94,51	(06)83,15	35,32
78	7a6m	M	68,05	81,99	(13)78,87	18,67

Índex fagocitário: percentual de monócitos fagocitando.

Total de indivíduos normais estudados: 28

* () número de ordem do soro de paciente.

Capacidade fagocitária de monócitos de pacientes com doença falciforme. Prova realizada com eritrócitos de carneiro (EA) e partículas de zimosan incubadas ou não (ZNI) com soro de paciente (Zsp) ou soro normal (Zsnl).

Nº	ORDEM	IDADE	SEXO	EA	Zsnl	Zsp	Zni
01	SS	5a	M	266	-	-	-
02	SS	6a	M	180	371	236	148
03	SS	6a	F	251	320	426	-
04	S β^0	6a	F	233	353	-	98
06	S β^0	6a	F	-	271	572	-
07	SS	11a	F	274	-	245	220
08	SS	13a	F	191	543	-	187
09	SS	11a	F	215	716	529	287
10	SS	1a3m	F	127	492	416	213
11	SS	13a	F	209	324	324	178
12	SS	1a9m	F	256	415	314	135
13	SS	3a	F	203	352	324	170
14	SS	6a	F	383	-	282	165
15	SS	5a	F	210	293	400	166
16	SS	5a9m	M	209	359	376	136
17	SS	5a	F	164	285	349	108
18	SS	11a	F	159	400	334	-
19	SS	4a	F	zero	382	328	-
20	SS	7a	M	299	374	514	134
21	S β^+	6a	F	349	390	339	145
22	S β^+	42	M	203	264	254	152
23	SS	11a	M	223	323	379	179
24	SS	7a	F	284	411	351	-
25	SS	4a	M	142	332	352	159
26	S β^0	4a	F	227	418	429	166
27	SS	4a	M	248	389	364	150
28	S β^0	11a	F	219	301	323	153
29	SS	7a	F	224	360	376	149
30	SC	9a	M	258	556	392	328
31	S β^0	8a	M	247	320	-	109
32	SS	6a	F	127	355	278	221
33	SS	8a10m	F	zero	383	385	271
34	SS	2a7m	M	162	348	390	150
35	SS	3a	F	151	377	409	156
36	SS	10a	M	161	357	309	140
37	SC	3a	F	161	302	386	136
38	SC	7a	F	200	359	244	148

Capacidade fagocitária: número de partículas fagocitadas/100 monócitos.

Total de pacientes estudados: 37 (SS= 27; S/ β^0 = 5; S/ β^+ = 2; SC= 3).

Capacidade fagocitária de monócitos de indivíduos normais. Prova realizada com eritrócitos de carneiro (EA) e partículas de zimosan incubadas ou não (ZNI) com soro de paciente (Zsp) ou soro normal (Zsnl).

Nº DE ORDEM	IDADE	SEXO	EA	Zsnl	Zsp	Zni
48	9a	M	264	454	*(14)469	170
49	5a	M	284	431	(10)458	144
50	8a	F	301	603	(36)537	195
51	3a6m	M	211	515	(07)451	138
52	2a8m	M	227	-	- -	-
53	6a	M	297	426	(30)474	211
54	5a	M	283	523	(20)444	165
57	6a9m	F	271	-	(24)450	-
58	7a	F	293	638	(32)619	220
59	4a	F	182	606	(35)449	-
60	11a	M	283	669	- -	168
61	1a9m	F	243	526	(31)386	163
62	10a	M	308	-	(06)351	229
63	12a	M	313	474	(29)469	203
64	2a3m	F	252	475	(15)576	-
65	9a	F	308	621	(18)484	-
66	4a	M	323	595	(08)571	222
67	10a	F	313	652	(16)632	-
68	13a	F	319	342	(29)424	269
69	9a2m	F	299	476	(18)572	185
70	9a9m	M	327	442	(17)451	162
72	1a6m	F	259	423	(10)412	-
73	4a6m	F	259	508	(14)558	156
74	9a	M	254	546	(07)584	200
75	8a	M	257	634	(24)646	203
76	9a	M	299	559	(31)571	179
77	6a3m	F	383	737	(06)533	199
78	7a6m	M	319	423	(13)568	196

Capacidade fagocitária: número de partículas fagocitadas/100 monócitos.

Total de indivíduos normais estudados: 28.

* () número de ordem do soro de paciente.

Valores de "Pitted cells" em Crianças com Doença Falciforme

ORDEM	IDADE	SEXO	PADRÃO ELETROFORÉTICO	PITS%
01	5a	M	SS	19,6
02	6a	M	SS	10,7
03	6a	F	SS	24,2
04	6a	F	S β^0	11,6
06	6a	F	S β^0	41,1
07	11a	F	SS	29
08	13a	F	SS	32,2
09	11a	F	SS	36,6
10	1a3m	F	SS	16
11	13a	F	SS	30,1
12	1a9m	F	SS	14
13	3a	F	SS	31
14	6a	F	SS	37
15	5a	F	SS	24,7
16	6a9m	M	SS	13,8
17	5a	F	SS	1,2
18	11a	F	SS	19,8
19	4a	F	SS	14,6
20	7a	M	SS	33,2
21	6a	F	S β^+	37
22	4a	M	S β^+	8,4
23	11a	M	SS	33,2
24	7a	F	SS	19,6
25	4a	M	SS	11,8
26	4a	F	S β^0	9,4
27	4a	M	SS	23,8
28	7a	F	S β^0	16,4
29	7a	F	SS	33
30	9a	M	SC 0	9,6
31	8a	M	S β^0	5,0
32	6a	F	SS	33,2
33	8a10m	F	SS	25,4
34	2a7m	M	SS	22,6
35	3a	F	SS	22
36	10a	M	SS	24,6
37	3a	F	SC	10,2
38	7a	F	SC	5,9

Total de pacientes estudados: 37 (SS= 27; S/ β^0 = 5; S/ β^+ = 2; SC= 3).